

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



Bc. Kristýna Marková

## **Evoluční a embryonální vývoj prechordální části hlavy**

Evolutionary and embryonic formation of the prechordal part of vertebrate head

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Robert Černý, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.1.2020

.....

*Na tomto místě bych ráda poděkovala v první řadě svému školiteli Robertovi, za jeho cenné rady ať už během celého mého studia či při sepisování této diplomové práce, ale také za možnost zabývat se tak zajímavým tématem.*

*V další řadě bych ráda poděkovala všem kolegům z laboratoře, jmenovitě Martinovi, Honzovi, Aničce a Vláďovi za jejich užitečné rady či poskytnutí dat, Viky a Agátě za to, že byly skvělé parťačky a že se na ně dalo vždy spolehnout ať už v laboratoři či mimo ni.*

*V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým nejbližším, že po celou dobu studia při mě stáli a podporovali mě, i když to občas nebylo jednoduché.*

## Abstrakt

Rostrální, tedy prechordální část hlavy obratlovců je jedním z hlavních znaků, který nás odlišuje od ostatních strunatců. Součástí této tzv. nové hlavy je i prechordální destička, známá také jako prechordální či premandibulární mezoderm, axiální mezoderm, nebo ventrální kraniální mezoderm. Tato nejrostrálnější populace mezendodermu má vývojově pocházet z rozvolněného anteriorního konce struny hřbetní, tvoří hlavový mezenchym, a později přispívá do tzv. hlavových kavit a do okohybných svalů. V této práci zkoumám nejranější vývoj prechordální destičky u jesetera, kostlína a bichira, u kterých bylo nedávno popsáno endodermální předústní střevo jako nejrostrálnější struktura hlavy. Za pomoci histologické analýzy, imunohistochemie a *in situ* hybridizace jsem analyzovala vývojový vztah prechordální destičky a předústního střeva, a objevila jsem, že v raném vývoji rostrální části hlavy se nejprve objevuje jasně definovaný endodermální epitel, tedy předústní střevo. Mezenchymální populace prechordální destičky vzniká až později, a to jednak uvolňováním buněk z anteriorního konce struny hřbetní, ale také z mezenchymu vznikajícího z posteriorní části předústního střeva v oblasti kolem rostrálního konce mozku. Buňky prechordální destičky se později rozšiřují do laterální oblasti do blízkosti optického váčku, kde u jesetera a kostlína vytvářejí hlavové kavity, zatímco u bichira zde zůstává pouze nahuštěný mezenchym. Ukazuje se tedy, že endodermální předústní střevo se objevuje v ontogenezi dříve, a dává vznik anteriorní části mezenchymální populace tzv. prechordální destičky, která je tedy duálního embryonálního původu. Ve své práci jsem tedy identifikovala unikátní populaci hlavového mezenchymu vznikající epitel-mezenchymální tranzicí přímo z endodermu.

**Klíčová slova:** prechordální destička, nová hlava obratlovců, předústní střevo, struna hřbetní, hlavový mezenchym, hlavové kavity



## Abstract

Rostral or the prechordal part of the vertebrate head is one of the key features that distinguishes us from other chordates. A part of this so-called New head is also a prechordal plate, also known as the prechordal or premandibular mesoderm, axial mesoderm or ventral cranial mesoderm. This most rostral population of the mesendoderm should develop from the anterior end of the notochord. It forms the head mesenchyme, and later contributes to the so-called head cavities and ocular muscles. In this work, I analyze the earliest development of the prechordal plate in sturgeon, gar and bichir, in which the endodermal preoral gut has recently been described as the most rostral head structure. Using histological techniques, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization, developmental relationship of the prechordal plate and preoral gut has been analyzed. and In the rostral part of the forming head, it is the preoral gut as clearly defined endodermal epithelium, that appears first. The mesenchymal population of the prechordal plate arises only later, and has dual embryonic origin. Its posterior part takes its origin from the anterior end of the notochord, whereas its anterior part develops from the preoral gut around the rostral end of the brain. The prechordal plate later expands to the lateral region near the optical vesicle where they form head cavities in sturgeon and gar. Thus, the endodermal preoral gut appears earlier in ontogenesis, giving rise to the anterior portion of the mesenchymal population of the so-called prechordal plate. This unique mesenchyme of the rostral head thus forms by the epithelial-mesenchymal transition directly from the endoderm.

**Key words:** prechordal plate, vertebrate new head , preoral gut, notochord, head mesenchyme, head cavities

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>1</b>
1.1. Vývoj prechordální destičky	2
1.1.1. Raná fáze prechordální destičky	2
1.1.2. Deriváty prechordální destičky	3
1.1.3. Shrnutí vývoje prechordální destičky	4
1.2. Předústní střevo u bazálních paprskoploutvých ryb	5
1.3. Předústní střevo vs. prechordální destička	6
<b>2. Materiál a metody</b>	<b>8</b>
2.1. Embryonální materiál	8
2.1.1. Fixace embryí	8
2.2. Histologická analýza	8
2.2.1. JB4 - pryskyřice	8
2.3. Imunohistochemie	9
2.3.1. – Krájecí techniky pro imunohistochemii	9
2.3.1.1. Vibratomové řezy – agaróza	9
2.3.1.2. Vibratomové řezy - glutaraldehyd	10
2.3.1.3. Parafínové řezy	10
2.3.2. Značení pomocí protilátek	10
2.4. WISH (Whole-mount <i>In situ</i> hybridizace)	11
2.5. Obrazová analýza	11
<b>3. Výsledky</b>	<b>12</b>
3.1. Jeseter malý ( <i>Acipenser ruthenus</i> )	13
3.1.1. Raná fáze	13
3.1.2. Střední fáze	13
3.1.3. Pozdní fáze	14
3.2. Kostlín mexický ( <i>Atractosteus tropicus</i> )	15
3.2.1. Raná fáze	15
3.2.2. Střední fáze	16
3.2.3. Pozdní fáze	17
3.3. Bichir senegalský ( <i>Polypterus senegalus</i> )	18
3.3.1. Raná fáze	18

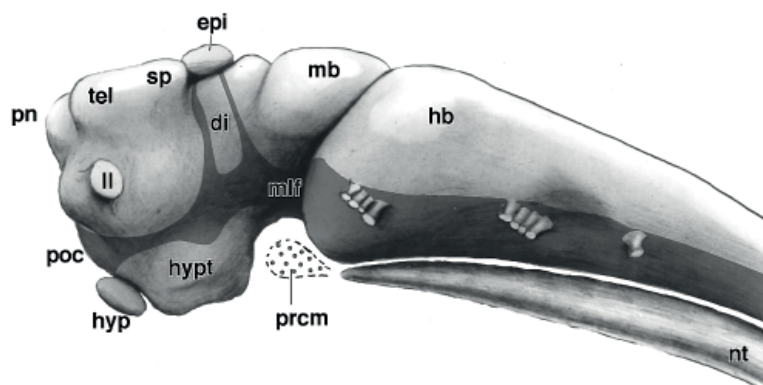
3.3.2. Střední fáze	18
3.3.3. Pozdní fáze	19
3.4. Shrnutí výsledků	20
3.4.1. Raná fáze	20
3.4.2. Střední fáze	20
3.4.3. Pozdní fáze	21
<b>4. Tabule</b>	<b>23</b>
<b>5. Diskuze</b>	<b>93</b>
5.1. Vývoj prechordální destičky v kontextu předústního střeva	93
5.1.1 Raná fáze - v nejanteriornější části hlavy se nachází pouze epitel předústního střeva, žádný mezenchym prechordální destičky	93
5.1.2. Střední fáze - vznik prechordální destičky ze struny hřbetní a zároveň z endodermu předústního střeva	94
5.1.3. Pozdní fáze - buňky prechordální destičky přispívají do hlavového mezenchymu a hlavových kavit	96
<b>6. Závěr</b>	<b>98</b>
<b>7. Citace</b>	<b>99</b>

# 1. Úvod

Prechordální část hlavy obratlovců (Vertebrata) je, jak už název napovídá, oblast nacházející se před strunou hřbetní. Tato oblast je u obratlovců také známá jako tzv. nová hlava (Northcutt a Gans, 1983; Gans a Northcutt, 1983). Tato nová hlava je unikátní pro nás obratlovce, neboť u ostatních strunatců (Chordata) se žádný volný prostor před strunou hřbetní nenachází (kupř. Satoh, 2016; Geisler a Zima, 2018). Jako typický příklad je uváděn kopínatec patřící do podkmene bezlebečných (Cephalochordata), u něhož struna hřbetní společně se somity zasahuje až do nejrostrálnější části jeho těla (kupř. Kardong, 2014; Onai a kol., 2014; Satoh, 2016). Nová hlava představuje klíčovou apomorfii podkmene obratlovců, a právě zde se vytváří prostor pro naše unikátní embryonální populace, jako jsou buňky neurální lišty a plakody (srv. Gans & Northcutt, 1985; Schlosser, 2005; Hall, 2009), ale také pro nediferencovaný hlavový mezoderm. Tento hlavový mezoderm bývá popisován od otické oblasti do nejrostrálnější části hlavy, zatímco posteriorním směrem se nacházejí pravé mezodermální somity (kupř. Hamilton, 1969; Lipton a Jacobson, 1974; Sambasivan a kol., 2011). Hlavový mezoderm můžeme dále rozčlenit na paraxiální a axiální mezoderm. Paraxiální mezoderm je ten, který se nachází v laterální oblasti, okolo struny hřbetní, a je ještě dále rozdělován od otické oblasti na tzv. somit 0, hyoidní mezoderm a mandibulární mezoderm, který je z těchto tří mezodermů umístěn nejrostrálněji (kupř. Sambasivan a kol., 2011; Onai a kol., 2014). Za axiální mezoderm je pak považován ten, který se nachází před strunou hřbetní, tedy v mediální oblasti. Název axiální mezoderm je kupř. používán u embrya dánie (kupř. Kimmel a kol., 1995; Schier a kol., 1997). Většina autorů v průběhu nejranějšího vývoje obratlovců označuje tuto populaci nejprve spíše jako mezendoderm pod názvem prechordální destička (kupř. Seifert a kol., 1993; Aoto a kol., 2009; Adachi a kol., 2012). V pozdějším vývoji je pak tato populace popisována už pouze jako prechordální mezoderm (kupř. Seifert a kol., 1993; Kundrát a kol., 2009), premandibulární mezoderm (kupř. Kuratani a kol., 1999; Adachi a kol., 2012), či ventrální kraniální mezoderm (kupř. Aoto a kol., 2009). Prechordální destička byla popisovaná od konce 19. a začátku 20. století, a to jako struktura, která se nachází před anteriorním koncem struny hřbetní (Oppel, 1890; Adelman, 1922; Allis, 1931).

V této diplomové práci se budu zabývat právě tímto nejrostrálnějším mezendodermem neboli prechordální destičkou (**Obrázek 1**), ze které později vzniká

**Obrázek 1:** Zobrazení prechordální části hlavy u embrya hybrida jesetera a vyzy. Před strunou hřbetní (nt) a pod přední částí mozku leží populace buněk prechordální destičky (prcm). (převzato od Kuratani a kol., 2000)



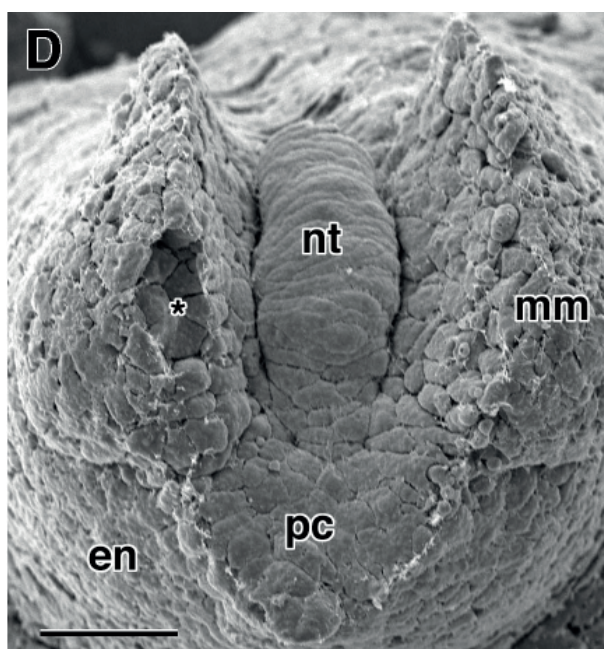
mezoderm i mezenchym, a který dává vznik tzv. hlavovým kavitám a později i části okohybných svalů (kupř. Wachtler a kol., 1984; Kuratani, 2005; Kuratani a Adachi, 2016). U prechordální destičky se zaměřím na její vznik a další vývoj v průběhu embryogeneze obratlovců, a také na deriváty, které z této populace buněk v přední části hlavy vznikají.

## 1.1. Vývoj prechordální destičky

### 1.1.1. Raná fáze prechordální destičky

V nejranějším vývoji je prechordální destička popisovaná jako mezendodermální populace buněk, jenž se nachází před strunou hřbetní (kupř. Sambasivan a kol., 2011; Adachi a kol., 2012; Onai a kol., 2014). Avšak u některých skupin, konkrétně u modelových druhů obratlovců, jako jsou dánío pruhované, drápatka vodní, kuře či myš, je vznik prechordální destičky odvozován už od procesu gastrulace (Gilbert a Barresi, 2016). U dánía se tato populace dostává před strunu hřbetní přes tzv. embryonální štít (kupř. Kimmela kol., 1995; Montero a kol., 2005), u drápatky přes blastoporus (kupř. Winklbauer a Schurfeld, 1999; Winklbauer a Damm, 2012), u kuřete přes tzv. Henzelův uzel (kupř. Meier, 1981; Schoenwolf a kol., 1992; Psychoyos a Stern, 1996) a u myši přes tzv. primitivní proužek (kupř. Tam a Behringer, 1997; Robb a Tam, 2004). Všechny výše uvedené názvy představují tzv. gastrulační organizátory, přes které se do vnitřní části embrya dostávají buňky z jejího povrchu a vytváří tam specifické buněčné populace (srv. Gilbert, 2017).

U nemodelových obratlovců je prechordální destička popisovaná spíše až v pozdější fázi embryonálního vývoje, většinou při začínající neurulaci, tedy při procesu vzniku neurální trubice (srv. Colas and Schoenwolf, 2001). Vznik mezendodermální prechordální destičky je typicky popisován tak, že struna hřbetní se začíná v přední části rozvolňovat a dochází k tomu, že se tato populace začíná rozšiřovat do rostrální části hlavy. Tato populace buněk uvolňovaných ze struny hřbetní a ležící na střeše prvostřeva je pak popisovaná jako mezendodermální prechordální destička (srv. Adachi a kol., 2012). V ranějším vývoji leží pouze v mediální části hlavy, a to mezi vyvíjejícím se mozkem a svrchní stěnou prvostřeva (srv. Kuratani a kol.,



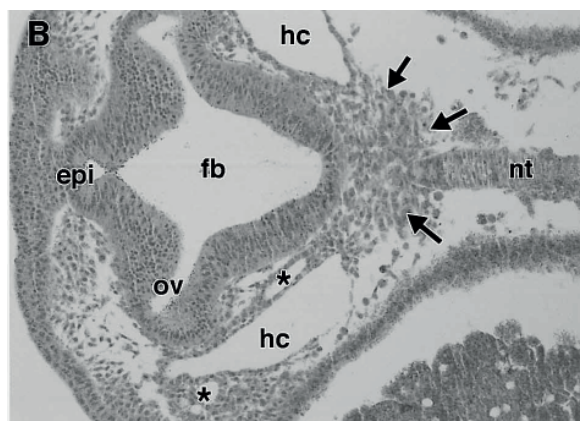
**Obrázek 2:** Prechordální destička ve své rané fázi u embrya mihule (anteriorní pohled). Prechordální destička (pc) je stále propojena se strunou hřbetní (nt) a rozšiřuje se anteriorním/rostrálním směrem. en - endoderm; mm - mandibulární mezoderm (převzato od Kuratani a kol., 1999)



1999). V této fázi je také stále propojena se strunou hřbetní (**Obrázek 2**). Ačkoliv jsme v předcházejícím odstavci mluvili o prechordální destičce vznikající u kuřete už během gastrulace, jiní autoři u tohoto obratlovce popisují její vznik až z existující struny hřbetní (kupř. Seifert a kol., 1992; Seifert a kol., 1993). Tato populace zde není nazývána prechordální destičkou, ale obecně jako prechordální mezoderm, a zůstává omezena pouze na oblast před strunou hřbetní (Seifert a kol., 1993).

### 1.1.2. Deriváty prechordální destičky

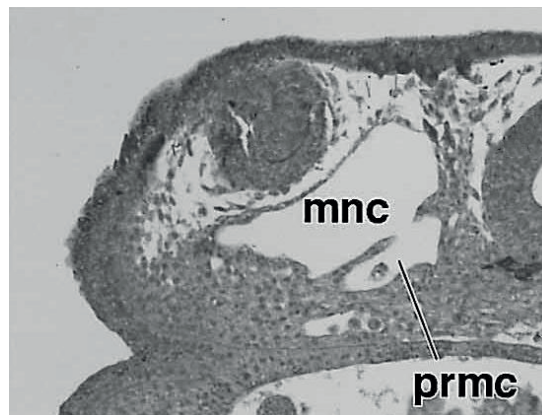
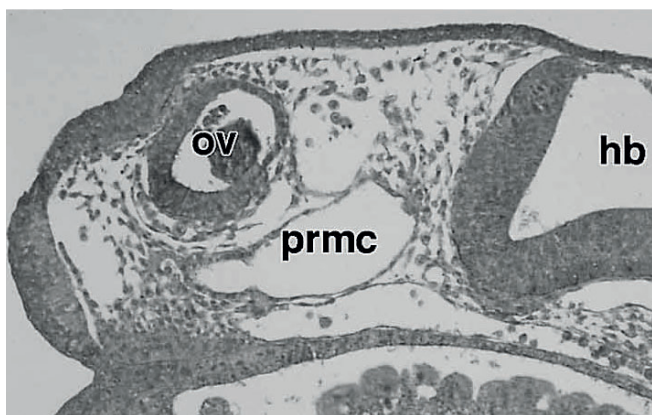
U embrya jesetera, konkrétně u hybrida jesetera malého a vyzy velkého, je prechordální destička popisovaná také až v pozdějším vývoji. Popis prechordální destičky začíná, až když je struna hřbetní na anteriorním konci uzavřená a prechordální destička je popisovaná jako mezenchymální populace, která se topograficky nachází v oblasti před strunou hřbetní (**Obrázek 3**). Tato populace se pak postupně rozšiřuje do laterální oblasti hlavy, kde svými buňkami přispívá do tzv. hlavových kavit (Kuratani a kol., 2000). Prechordální destička však zřejmě přispívá pouze do nejpřednějšího páru hlavových kavit (Kuratani a kol., 2000; Adachi a kol., 2012). Hlavové kavity vznikají z malých hlavových cyst, které se vytváří v oblasti za optickým váčkem. Hlavové cysty mohou mít různý tvar a později se spojují a



**Obrázek 3:** Dorzální pohled na oblast hlavy u embrya hybrida jesetera a vyzy (hlava směřuje doleva). Černé šipky ukazují na mezenchymální populaci prechordální destičky ležící před strunou hřbetní (nt). Tato mezenchymální populace se rozšiřuje do laterální části hlavy k optickému váčku (ov) a přispívá do hlavových kavit (hc). epi - epifýza; fb - přední mozek (převzato od Kuratani a kol., 2000)

tvoří celistvé dutiny, popisované jako hlavové kavity (Adachi a kol., 2012). U embrya krokodýla byly v optické oblasti popsány i další různé mikrokavity (Kundrát a kol., 2009). V pozdějším vývoji embrya přispívají buňkami při vytvoření okohybných svalů oka (kupř. Watchler a kol., 1984; Couly a kol., 1992; Noden a kol., 1999).

U bezčelistnatců (Cyclostomata) se hlavové kavity nevytváří, i když u mihule můžeme v této oblasti pozorovat hlavový mezoderm (Kuratani a kol., 1999), a dokonce u ní nalezneme i okohybné svaly (Suzuki a kol., 2016). Největší počet hlavových kavit se vytváří u embrya žraloka, který má tři páry, rozlišené na premandibulární, mandibulární a hyoidní (Balfour, 1878; Adachi a kol., 2012). U paprskoploutvých ryb (Actinopterygii) byly hlavové kavity popisovány u hybrida jesetera a vyzy, kde nacházíme dva páry, které jsou ovšem částečně navzájem propojené (**Obrázek 4**) (Kuratani a kol., 2000). U zástupců plazů jsou popisovány dva páry hlavových kavit, typicky jako premandibulární a mandibulární, s tím že hyoidní pár nevytváří stejnocennou dutinu, jako ty předchozí kavity (Wedin, 1949; Kundrát a kol., 2009). U kuřete je popisován jen jeden pár hlavových kavit, a to ten vznikající z populace buněk prechordální destičky (Adelmann, 1926).



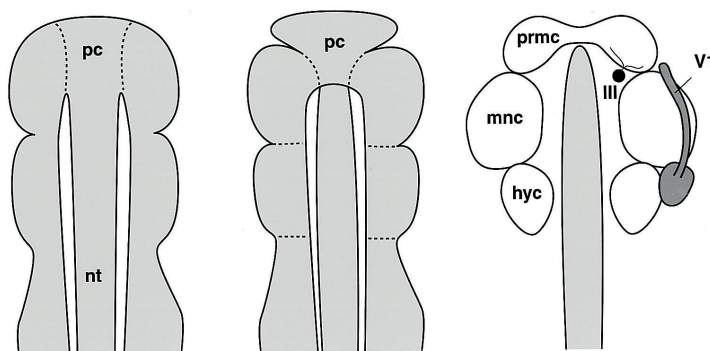
**Obrázek 4:** Laterální pohled na hlavu embrya hybrida jesetera a vyzy (hlava směřuje doleva). Oba snímky znázorňují průřez hlavou v oblasti optického váčku (ov) a pod optickým váčkem ležící dva páry hlavových kavit, premandibulární (prmc) a mandibulární kavita (mnc). Na smínce vpravo můžeme pozorovat vzájemné propojení mezi těmito dvěma páry kavit. hb - střední mozek (převzato od Kuratani a kol., 2000)

### 1.1.3. Shrnutí vývoje prechordální destičky

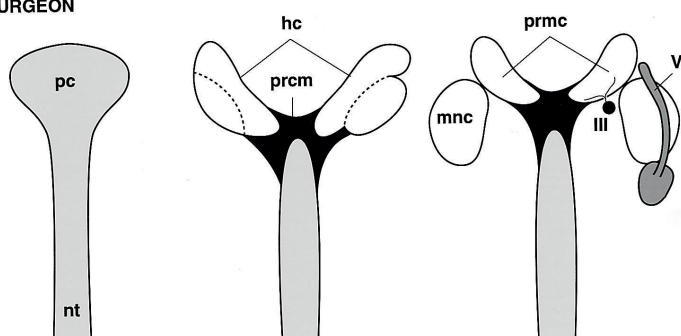
Prechordální destička je tedy popisovaná jako mezendodermální populace, která se nachází před strunou hřbetní a rozšiřuje se do vznikající rostrální části hlavy (kupř. Kuratani a kol., 1999; Adachi a kol., 2012). Později zřejmě dochází k vymizení této populace z nejrostrálnější části a zůstává pouze posteriorní populace před strunou hřbetní, která je často označovaná jako prechordální či premandibulární mezoderm (kupř. Seifert a kol., 1993; Adachi a kol., 2012). Z této oblasti se dále rozšiřuje do laterální oblasti, kde přispívá do hlavových kavit (**obrázek 5**) (Kuratani a kol., 2000;

**Obrázek 5:** Vývoj prechordální destičky znázorněný u embrya žraloka (horní schéma) a embrya hybrida jesetera a vyzy (dolní schéma). V rané fázi je prechordální destička (pc) propojena se strunou hřbetní (nt). Později už propojeny nejsou a z této mediální části se rozšiřují mezenchymální buňky prechordální destičky (prcm) do laterální části a přispívají do hlavových kavit (hc). hyc - hyoidní kavity; mnc - mandibulární kavity; prmc - premandibulární kavity (převzato od Adachi a kol., 2012)

SHARK



STURGEON

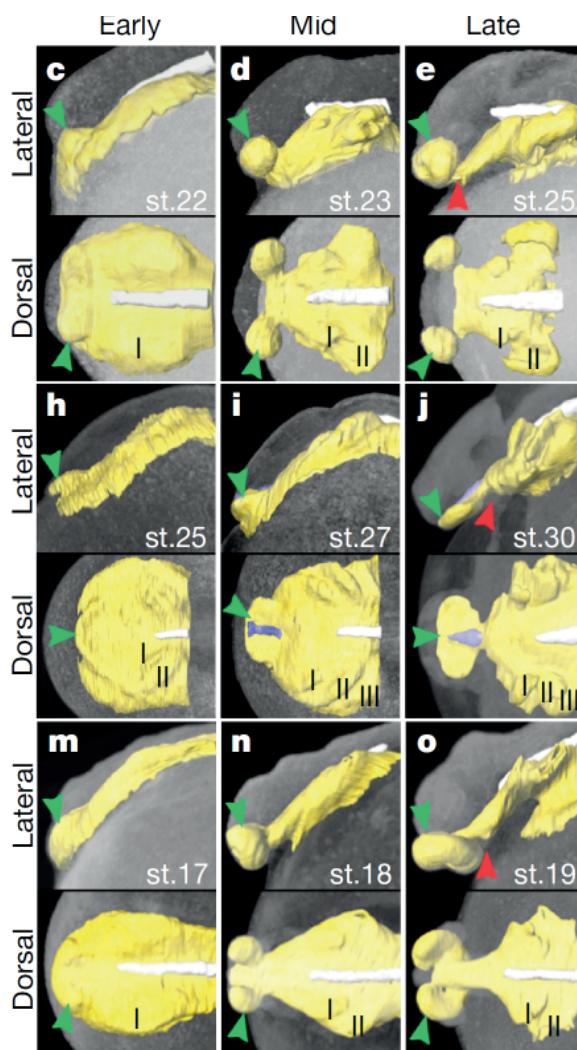


Adachi a kol., 2012), které v pozdějším vývoji vytvářejí část okohybných svalů oka (kupř. Watchler a kol., 1984; Couly a kol., 1992; Noden a kol., 1999).

## 1.2. Předústní střevo u bazálních paprskoploutvých ryb

Předústní střevo bylo u obratlovců popisováno jako nejanteriornější endoderm prvostřeva, který se nachází pod neurální ploténkou/kýlem, čili budoucím mozkem, a nezasahuje anteriorněji (srv. Allis, 1938; Adachi a kol., 2012). Nikdy se tedy nepředpokládalo, že by endoderm mohl zasahovat před neurální soustavu. Toto tvrzení ale vyvrátili kolegové z naší laboratoře článkem Minařík a kol., 2017. Při zkoumání embryí tří druhů tzv. bazálních ryb – jesetera, kostlína a bichira bylo objeveno masivní předústní střevo, které v pozdější fázi u kostlína a bichira vytváří cementové orgány a u jesetera tzv. klubací žlázu (Minařík a kol., 2017). Toto předústní střevo ve svém časném vývoji zasahuje až před neurální ploténku/kýl, a vytváří tak nejanteriornější strukturu v oblasti hlavy (**Obrázek 6**) (Minařík a kol., 2017). Z tohoto důvodu bylo tedy zajímavé dále prozkoumat vývojovou a topografickou souvislost prechordální destičky a předústního střeva během raného vývoje.

**Obrázek 6:** Laterální a dorzální pohled na hlavu embrya bichira (horní řádky), jesetera (prostřední řádky) a kostlína (dolní řádky). Hlava vždy směřuje doleva. Znárodnění vývoje endodermálního předústního střeva (zelené šipky) u tří druhů paprskoploutvých bazálních ryb. Předústní střevo se nachází v nejanteriornější části hlavy těchto embryí. U bichira se z předústního střeva vyvíjí dva cementové orgány, u jesetera endodermální destička (klubací žláza) a u kostlína několik cementových orgánů ležících těsně u sebe. Červené šipky značí pozici primárních úst. (převzato od Minařík a kol., 2017)

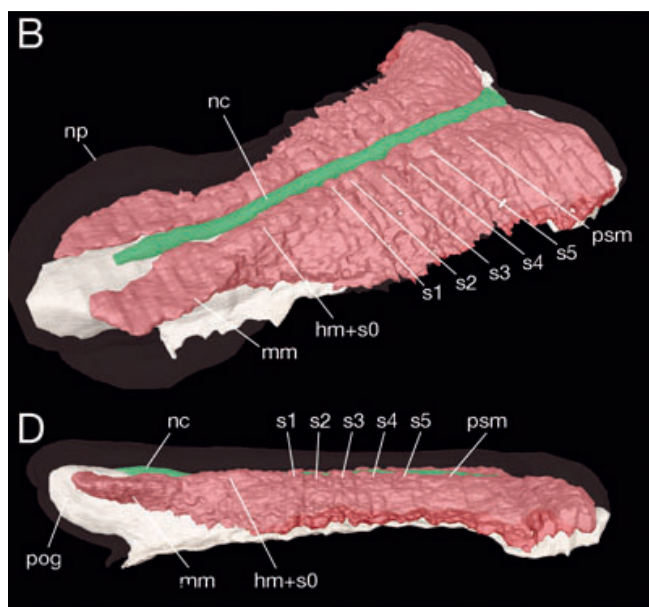




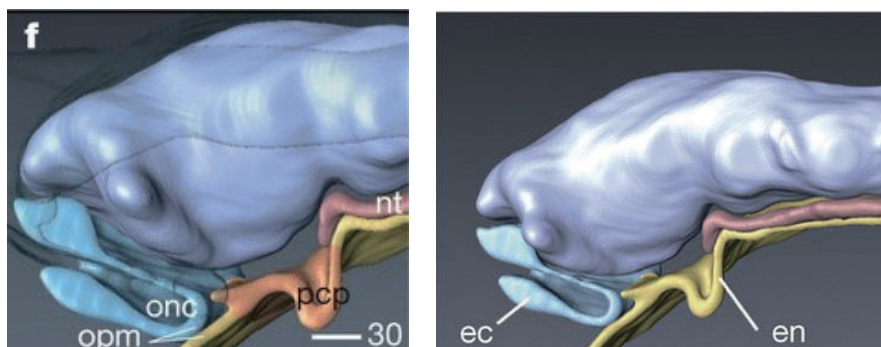
### 1.3. Předústní střevo vs. prechordální destička

Předústní střevo je tedy podle Minaříka (Minařík a kol., 2017) nejanteriornější struktura, která se ve vznikající hlavě vyskytuje. Podobně je však u Adachiho (Adachi a kol., 2012) znázorňovaná prechordální destička. Zajímavé však je, že i tito autoři před samotným vznikem prechordální destičky vykazují ve svých obrázcích právě v této anteriorní oblasti i jasné endodermální předústní střevo (**Obrázek 7**) (Adachi a kol., 2012). Zdá se tedy, že prechordální destička se může objevovat až v pozdější fázi vývoje, kdy se rozšiřuje od struny hřbetní až do anteriorní části hlavy. V této fázi se tam podle autorů už předústní střevo nevyskytuje a tedy nejanteriornějším koncem se stává mezendodermální prechordální destička (Adachi a kol., 2012).

Mezendodermální prechordální destička je u některých dalších obratlovců občas znázorňovaná jako součást endodermálního epitelu, tedy jako součást prvostřeva. U embrya myši je dokonce označena v prvostřevu pomocí genu *gooseoid* (*gsc*) (Belo a kol., 1998), který by měl označovat právě populaci buněk prechordální destičky (kupř. Belo a kol., 1998; Suzuki a kol., 2016; Wang a kol., 2019). I u embrya kuřete je prechordální destička prvotně popisovaná jako buňky, které se uvolňují z anteriorní stěny prvostřeva, což by naznačovalo souvztažnost populace buněk prechordální destičky a endodermálního epitelu (Seifert a kol., 1993). Další



**Obrázek 7:** Raná fáze vývoje embrya žraloka před vznikem prechordální destičky. Do nejanteriornější části hlavy zasahuje předústní střevo (pog). Před strunou hřbetní (nc) se ještě žádná populace buněk prechordální destičky nenachází. (převzato od Adachi a kol., 2012).



**Obrázek 8:** Prechordální destička u embryí sliznatky (hlava směřuje doleva). Obrázky pochází z dvou různých článků. Na levém obrázku je prechordální destička (pcp) zobrazena v endodermu prvostřeva. Na pravém obrázku ovšem toto zobrazení autoři neuvádí a už se tam nachází pouze prvostřevo (en). (převzato od Oisi a kol., 2013 a od Sugahara a kol., 2016)

případ vztahu endodermu a prechordální destičky lze pozorovat u embryí sliznatky, kde tato dle obrázků jasně endodermální struktura byla označena za prechordální destičku pouze z hlediska své topografické pozice (srv. Oisi a kol., 2013). Tytéž autoři však v článku o pár let později tuto oblast u sliznatky označují za součást prvostřeva (**Obrázek 8**) (Sugahara a kol., 2016).

Cílem této diplomové práce bude popsat vznik prechordální destičky u tzv. bazálních paprskoploutvých ryb. U jesetera, kostlína a bichira, jak už bylo popsáno výše, se během rané embryogeneze vytváří endodermální předústní střevo, které zasahuje až před neurální ploténku/kýl (Minařík a kol., 2017). Vznik populace buněk prechordální destičky a případný vztah k předústnímu střevu v pozdějších fázích vývoje však není znám a bude předmětem mého zájmu, a tedy i této diplomové práce.

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Embryonální materiál

Pro mé experimenty jsem použila následující obratlovčí modely z naší laboratoře: jeseter malý (*Acipenser ruthenus*), kostlín mexický (*Atractosteus tropicus*) a bichir senegalský (*Polypterus senegalus*). Jednotlivá embryonální stádia těchto druhů byla získána z různých zdrojů.

Jeseteři pochází z chovů Výzkumného ústavu rybářského a hydrobiologického ve Vodňanech, a to ve spolupráci s Ing. Davidem Gelou, PhD. Z výzkumného ústavu jsme si přivezli oplozená vajíčka do našeho chovu, a tam je při nízké teplotě vyvíjeli do požadovaných stádií.

Pro kostlínky naše laboratoř začala jezdit až do vzdáleného Mexika, přesněji na Universidad Juaréz Autónoma de Tabasco a to ve spolupráci s Leninem Arias Rodriguezem, PhD. Embrya se ještě usmrtila v Mexiku v požadovaných stádiích.

Bichiři pochází z chovů Katedry zoologie Přírodovědecké fakulty UK a z předchozího chovu od soukromého chovatele pana Tichého z Kravař. Embrya byla odchována v teplém prostředí do požadovaných stádií.

Embryonální stádia nacházející se v této práci byla rozdělena podle následujících vývojových tabulí, a to při normálním vývoji embryí. Jeseter ve stádiu 20-26 (Dettlaff a kol., 1993), kostlín ve stádiu 16-22 (Long and Ballard, 2001) a bichir ve stádiu 20-26 (Diedhiou and Bartsch, 2009).

#### 2.1.1. Fixace embryí

Embrya byla nejprve uspaná, a to za pomoci rybího anestetika MS-222 (serva), poté byla usmrcena a fixovaná v 4% roztoku paraformaldehydu (PFA). Tyto embrya byla použita pro histologickou analýzu. Pro protilátkové barvení byla použita embrya fixovaná ve 100% metanolu nebo v 4% roztoku PFA, a pro *in situ* hybridizaci pouze embrya fixovaná ve 100% metanolu. Pro fixaci ve 100% metanolu se musela embrya nejprve fixovat v 4% roztoku PFA, a to minimálně 3-12 hodin. Dále se postupně vzestupnou metanolovou řadou převedly do 100% metanolu a následně umístily do mrazáku při -20 °C.

### 2.2. Histologická analýza

Pro vytvoření histologických řezů jsem využila metodu, která pracuje s pryskyřicí JB4. Všechny uvedené histologické řezy jsou nařezány pomocí této metody.

#### 2.2.1. JB4 - pryskyřice

Fixovaná embrya byla převedena na 1x10 minut do PBS. Dále se embrya postupně převedla do 100% etanolu a to alkoholovou vzestupnou řadou (25-50-70-

80-90-96-100%). V jednotlivém alkoholu byla embrya po dobu 10 minut. Následně byla embrya převedena do A+C pryskyřice JB4 a ponechána v tomto roztoku přes noc. Další den byla převedena do silikonové destičky a zalita roztokem A+C+B pryskyřice JB4 podle daného protokolu. Jamka silikonové destičky obsahující jedno embryo byla překryta paraplastem z důvodu, aby se zamezil přívod vzduchu a roztok tak mohl zpolymerizovat (cca 1 den). Tento proces polymerizace se může urychlit pomocí plynného dusíku v exikátoru (cca 2-3 hodiny), a to díky Laboratoři elektronové mikroskopie PŘF UK. Zatuhlý bloček si nejprve upravíme žiletkou a následně nalepíme na plastové terčiky pomocí vteřinového lepidla. Po zaschnutí řežeme 5 µm tenké řezy na mikrotomu Leica RM 2155. Jednotlivé řezy převádíme na sklíčka, která máme nahřátá na plotýnce. Řezy nejprve položíme do kádinky s vodou a následně přeneseme na již zmíněné předeřáté sklíčko. Sklíčka s řezy necháme přes noc na plotýnce a následující den je obarvíme roztokem Azur B/Eozinem po dobu 3 minut a poté je aspoň 3x promyjeme v destilované vodě. Sklíčka položíme na plotýnku, a když jsou dostatečně suchá, přiložíme krycí sklíčko s nanesenou pryskyřicí DPX. Sklíčka necháme na vodorovné podložce zaschnout do následujícího dne.

## **2.3. Imunohistochemie**

Pomocí protilátek, byla označena určitá stádia studovaných embryí, čímž jsme dostali další podrobnější analýzu. Pro tuto analýzu se dá využít různých technik, kterými jsou např. vibratomové řezy, a to buď zalité v agaróze nebo glutaraldehydu, nebo se dají použít řezy parafínové. Vyzkoušela jsem všechny výše zmíněné techniky a nejvíce se mi osvědčily vibratomové řezy, a to zalité v agaróze nebo glutaraldehydu. Parafínové řezy se u takto raných stádií snadno potrhají a bohužel nevycházela ani barvicí část. V této práci tedy nakonec uvádím řezy zalité v agaróze, i když tato technika také není příliš vhodná na raná stádia některých zkoumaných druhů, jako je kupříkladu jeseter. Raná embrya se snadno potrhají a z několika nařezaných embryí většinou zůstane jenom jedno či žádné. Naproti tomu řezy zalité glutaraldehydu se tolik netrhají, ale tato sloučenina je zase vysoce autofluorescenční, což v některých případech ruší požadovaný signál.

### **2.3.1. – Krájecí techniky pro imunohistochemii**

#### **2.3.1.1. Vibratomové řezy – agaróza**

Pro tuto techniku byla použita embrya fixována v 4% roztoku PFA nebo 100% metanolu. Embrya převede do roztoku PBS, a poté do rozehřátého agaru, jež jsme si předtím namíchali (2 g agarózy: 40 ml PBS). Agar musí mít teplotu 65°C, embrya napolohujeme a necháme agar zatuhnout. Embrya přilepíme na bločky sekundovým lepidlem a krájíme na vibratomu na řezy silné 40 µm.

### **2.3.1.2. Vibratomové řezy - glutaraldehyd**

Embrya promyjeme v sestupné MetOH řadě (100-75-50-25%) 5-10 minut, a poté převedeme do PBS na 5 minut. Z mrazáku si předem vyndáme albumin a glutaraldehyd aby nám stihli rozmraznout. Embrya nejprve převedeme do albuminu, kde je krátce promyjeme a následně je dáme do roztoku albuminu a glutaraldehydu (toho přidáme 100  $\mu$ l). V tomto roztoku necháme embrya ztuhnout asi tak hodinu, a tak nám vznikne bloček, který poté krájíme na vibratomu na řezy silné 50  $\mu$ m.

### **2.3.1.3. Parafínové řezy**

Embrya byla odvodněna vzestupnou etanolovou řadou po dobu 10 minut a dále histosol/ xylen nebo xylen po dobu 20 minut. Embrya byla dále promyta ve směsi xylen/paraplast v poměru 1:1 a to při teplotě 58 °C. Poté byla embrya převedena do čistého paraplastu a tam po hodině 6x promyta. Po poslední výměně se embrya nechala v paraplastu přes noc a to stále při teplotě 58 °C. Další den se napolohovala v silikonové destičce a poté nechala ztuhnout. Po zatuhnutí byla embrya přilepena pomocí paraplastu na dřevěný bloček a následně krájena na mikrotomu. Řezy byly krájeny na tloušťku 10  $\mu$ m. Nakrájené řezy byly přesunuty na vodní hladinu a poté hned přeneseny na připravené sklíčko, které umístíme na plotýnku o teplotě 45 °C. Po zaschnutí byla sklíčka s řezy zapečena v peci při teplotě 58 °C po dobu 20 minut, kvůli jejich lepšímu přilnutí ke sklíčku. Řezy byly dále hydratovány v xylenu, sestupné etanolové řadě a destilované vodě po dobu 10 minut. Z destilované vody byly převedeny do kyvety s Antigen Retrieval (DAKO) a zahřáty ve vodné lázni na 97 °C po dobu 20 minut. Pak se nechaly 15 minut vychladnout v digestoři.

### **2.3.2. Značení pomocí protilátek**

Nařezané embrya dáme do petriho misky nebo když už to jsou řezy na sklíčkách, položíme je do vlhké komůrky a tyto řezy ještě obtáhneme hydrofóbní fixou. Jako první je zalijeme PBS a to na dobu 5 minut. Dále si z mrazáku vyndáme 1% roztokem bovine albumine sera (BSA) a necháme ho rozmraznout. Z petriho misek odsajeme PBS a napipetujeme tam 1% BSA a necháme ho 1 hodinu působit. Po hodině 1% BSA odsajeme a napipetujeme tam danou primární protilátku, v mém případě Fibronektin v poměru 1 (Fibronektin): 1000 (1%BSA), a necháme přes noc v lednici při teplotě 4 °C. Druhý den odsajeme primární protilátku a 3x5 minut promyjeme v roztoku PBS s 0,4% Tritonem. Po posledním odsátí napipetujeme sekundární protilátku (Alexa Fluor 488, 594 nebo 647) v poměru 1 (sekundární protilátka): 1000 (PBS) a necháme 2,5 hodiny působit při pokojové teplotě. Po uplynuté době promyjeme v PBS, poté převedeme na sklíčka, která jsou oblepená hydrofobní páskou, zakapeme Fluoroshieldem s DAPI (ten značí jádra buněk) a přikryjeme krycím sklíčkem. Nakonec okraje sklíčka zalakujeme lakem, aby nám řezy nevyschnuly.

## 2.4. WISH (Whole-mount *In situ* hybridizace)

Tuto analýzu zpracoval kolega Jan Štundl, takže její postup můžete nalézt v jeho diplomové práci (Štundl, 2013). I použitou próbu pro gen *gsc* zpracoval kolega Jan Štundl.

Má práce pak spočívala v nakrájení těchto embryí, a to pomocí vibratomových řezů zalitých v glutaraldehydu. Tato technika je popsána výše v podkapitole imunohistochemie. Řezy byly krájeny na tloušťku 50 µm. Po nakrájení byly ihned převedeny na sklíčka a zalepené fluoroshieldem s DAPI.

## 2.5. Obrazová analýza

Histologické, imunohistochemické i *in situ* hybridizační řezy byly analyzovány na mikroskopu Olympus BX 51. Snímky byly pořízeny kamerou Spot, a to v programu Spot Advanced. Snímky s protilátkovým barvením a *in situ* hybridizací byly dále upravovány v programu Fiji a histologické v programu Adobe Photoshop. Tabule jsou zhotoveny pomocí programu Adobe InDesign. Všechny uvedené snímky v jednotlivých tabulích byly pořízeny autorem této diplomové práce, pokud nebude uvedeno jinak (snímky pak budou v tabulích označeny konkrétními autory).



### 3. Výsledky

Podstatnou část této diplomové práce tvoří histologická analýza. Tato analýza má objasnit postupný vývoj populace buněk prechordální destičky v souvislosti s vývojem předústního střeva a struny hřbetní, a to na úrovni jednotlivých buněk, tedy jejich tvaru a pozice. Histologická analýza dokáže rozlišit epiteliální buňky od buněk mezenchymálních, můžeme tedy od sebe oddělit epiteliální buňky předústního střeva od mezenchymálních buněk prechordální destičky. Vznik populace buněk prechordální destičky bude popsán na třech druzích – jeseterovi, kostlínovi a bichirovi. Embrya těchto druhů byla detailně prostudována od rané neurulace až do jejich pozdního larválního vývoje, ale pro samotnou práci byla nakonec vybrána pouze ta stádia, která jsou klíčová pro samotný vývoj prechordální destičky.

Pro jednodušší pochopení vývoje prechordální destičky ve srovnávacím kontextu byl vývoj této oblasti rozdělen do tří fází, a to na ranou, střední a pozdní. Tyto fáze mají uceleně charakterizovat postupný vývoj prechordální destičky, přičemž raná fáze představuje stádium, kdy je v anteriorní části hlavy pozorováno jen předústní střevo jako čistě epiteliální struktura. Ve střední fázi se začínají objevovat i mezenchymální buňky, ale předústní střevo je stále dobře identifikovatelné, zatímco v pozdní fázi se předústní střevo mění na přichytné orgány a oblast přední hlavy se plní mezenchymem a vznikají deriváty, jako jsou hlavové kavity. Jednotlivé fáze se mohou u zkoumaných druhů lehce odlišovat, jak bude vykázáno na následujících stranách, ale popsáný trend vývoje má obecnou platnost.

Další analýza, která je v této práci uvedena představuje protilátkové barvení pomocí fibronektinu s DAPI. Fibronektin je protilátka, která označuje bazální laminu, a díky tomu můžeme dobře odlišit epiteliální populaci buněk od populace buněk mezenchymálních. V předložené diplomové práci je tato technika použita jen u konkrétních kritických stádií, a to nejčastěji ve střední fázi vývoje prechordální destičky. Tato technika je uvedena u všech zkoumaných druhů, přičemž u jesetera jen u jednoho stádia na frontálním řezu (viz. kapitola Materiál a metody).

Poslední metodou je *in situ* hybridizace pro gen *gsc* a *twist1*, která byla použita pouze u embryí jesetera. U kostlína se všechna hybridizovaná embrya rozpadla během použití této techniky. V této diplomové práci tedy nejsou pro *in situ* hybridizaci u kostlína žádné výsledky uvedeny. Pro embrya bichira nebyla zatím vyrobena specifická proba pro tento gen, proto ani u něj nejsou touto technikou uvedeny žádné výsledky. Gen *gsc* by měl představovat specifický marker, který označuje populaci buněk prechordální destičky v určitých fázích jejího vývoje (kupř. Belo a kol., 1998; Wang a kol., 2019). Pro tuto práci jsem ještě použila další specifický gen a to *twist1* (opět pouze pro embrya jesetera), který označuje populace vznikajících mezenchymálních buněk (kupř. Soo a kol., 2002).

Pro lepší orientaci ve výsledných tabulích jsem zavedla značení, které bude u všech druhů neměnné. Žluté šipky znázorňují uvolňování buněk z předústního střeva, červené šipky ze struny hřbetní. Oranžové hvězdičky či tečky znázorňují populaci buněk prechordální destičky.

### 3.1. Jeseter malý (*Acipenser ruthenus*)

#### 3.1.1. Raná fáze

Raná fáze vývoje prechordální destičky u jesetera probíhá ve stádiu 20. V tomto stádiu můžeme v nejrostrálnější části hlavy pozorovat masivní linii epiteliálních buněk endodermálního původu, která je součástí archenteronu, primární tělní dutiny a můžeme jí tedy definitivně označit za předústní střevo (srv. **Tab.1A a 1F**). Nad posteriorní částí předústního střeva leží linie buněk ektodermálního původu, tedy vznikající neurální ploténka (**Tab.1A**). Buňky předústního střeva a neurální ploténky přiléhají v této fázi vývoje těsně k sobě (**Tab.1B**). Jak můžeme vidět, tak se mezi těmito strukturami zatím nenachází žádné volné buňky, ani volný prostor pro uvolňování a migraci volných buněk, a to ani v mediální části těla embrya (**Tab.1E**). V posteriornější části hlavy nacházíme už pouze jednovrstevný endoderm prvostřeva a nad ním neurální ploténku (**Tab.1C, 1D a 1G**), a ani zde ještě nepozorujeme žádný volný prostor. V této fázi vývoje se struna hřbetní zdá být ve své anteriorní části kompaktní a zdá se, že rostrálně splývá s epitelem prvostřeva (**Tab.1H**).

#### 3.1.2. Střední fáze

Střední fáze probíhá do stádií 21 až 24. V této fázi už můžeme pozorovat, že mezi neurální ploténkou, předústním střevem a prvostřevem se objevují mezenchymální buňky (srv. **Tab.2A, 2E a 2F**). Ve stádiu 21 jsou buňky předústního střeva ve své anteriorní a tedy předneurální části stále epiteliální, ale v jeho posteriorní (neurální) části již lze pozorovat uvolňování buněk, a tedy přítomnost mezenchymálních buněk, které by mohly vytvářet anteriorní populaci prechordální destičky (**Tab.2A**). V této neurální části předústního střeva na sagitálním řezu můžeme vidět rozvolňování endodermálního epitelu (**Tab.2F**). Posteriořji, v neurální oblasti přilehlé ke struně hřbetní, je již pozorovatelná populace mezenchymálních buněk, a to v její mediální části, přičemž endodermální buňky v této části hlavy už mají opět charakter jednovrstevné epiteliální tkáně (**Tab.2B, 2C**). Zdá se, že tato posteriorní populace mezenchymálních buněk se uvolňuje ze struny hřbetní, jak můžeme pozorovat na jejím anteriorním konci, což naznačuje, že se jedná o posteriorní populaci budoucí prechordální destičky (**Tab.2G**). Ovšem tento proces probíhá pouze v anteriorní části struny hřbetní, posteriořji je struna hřbetní opět kompaktní (**Tab.2D**). V tomto stádiu je tedy možné rozlišit mezenchymální buňky jako buňky vznikající buď z posteriorního konce předústního střeva či z rostrální struny hřbetní, neboť mezenchymální buňky migrující z neurální lišty v tento moment ještě nemigrují. Tyto buňky migrují až od stádia 22+ (viz. Štundl, 2013).

Ve stádiu 22+ pozorujeme podobný vývoj jako v předchozím stádiu. Předústního střeva (**Tab.3A**) se zdá být v této jeho posteriorní části rozvolněné, je tedy možné, že se z něho uvolňují buňky (**Tab.3B**). Rostrální předústní střevo je v této fázi



kompatnější, buňky tvoří pravidelný vícevrstevný cylindrický epitel (**Tab.3F, 3G**), kromě jeho posteriorní části, ve které právě dochází už k výše zmiňovanému uvolňování buněk (**Tab.3B a 3G**). V mediální části embrya se mezi předústním střevem a strunou hřbetní nachází populace mezenchymálních buněk, která je teď početnější než ve stádiu 21+ (**Tab.3C, 3D**). Struna hřbetní ani v tomto stádiu není ve své anteriorní části zakončená, ale stále se z ní uvolňují buňky do anteriorní oblasti (**Tab.3H**), jež tvoří podstatnou část zmiňované anteriorní populace prechordální destičky (**Tab.3I**). V posteriornější části je struna hřbetní kompaktní a celistvá (**Tab.3E**). Na protilátkovém barvení pomocí protilátky fibronektin můžeme pozorovat mezenchymální populaci buněk v mediální části, přičemž můžeme vidět, že tyto buňky postrádají bazální laminu, kterou můžeme pozorovat okolo neurální ploténky (**Tab.4C, 4D**), což potvrzuje předchozí pozorování na histologických řezech. V této fázi, konkrétně u stádia 22 a 22+, můžeme předchozí data srovnat s genovou expresí genu *gsc*. Jeho signál pozorujeme pouze v mediální části hlavy embrya (**Tab.5A, 5D**), a to konkrétně v posteriorní části předústního střeva před neurální trubicí (**Tab.5B, 5E**). V této části také bylo na histologických řezech vidět uvolňování buněk, přičemž exprese genu *gsc* by mohla napovídat, že i tato anteriorní část mezenchymu tvoří prechordální destičky. Ve stádiu 23, kdy dochází k uzavírání neurální trubice, je signál stále přítomen v mediální části, ale je podstatně silnější (**Tab.6A**) než v předchozím stádiu. *Gsc* je stále exprimován v posteriorní části epiteliálního předústního střeva (**Tab.6B a 6C**). Srovnání exprese genu *twist1* pak naznačuje, že v mediální části (**Tab.6D**) dochází ke vzniku a uvolňování mezenchymálních buněk, tedy k epitelomezenchymální tranzici přímo z předústního střeva (**Tab.6E a 6F**).

Ve stádiu 24 je předústní střevo opět jasně epiteliální (**Tab.7A**), neboť pro jeho činnost tu přestává být dostatek místa kvůli zvětšování předního mozku (**Tab.7E**). Předústní střevo obkresluje těsnou linii s ektodermem a předním mozkem (**Tab.7F**). V posteriorní části mezi předústním střevem a strunou hřbetní je posteriorní populace buněk prechordální destičky v mediální části pozorovaná pouze před strunou hřbetní (**Tab.7G**). Ovšem tyto buňky nezmizely, ale zdá se, že jsou postupně vytlačovány do laterální části hlavy (**Tab.7B**). V laterální části je již však hůře identifikovatelné, které buňky pocházejí z této mediální části, a které pocházejí z migrace buněk neurální lišty (**Tab.7C**), ke které už v tomto stádiu v této oblasti hlavy dochází (viz. Štundl, 2013). Techniky používané v této diplomové práci neumožňují přesně odlišit, odkud daný mezenchym embryonálně pochází. Struna hřbetní není zcela kompaktní ve své anteriorní části, ale můžeme pozorovat, že dochází k jejímu částečnému uzavírání (**Tab.7G**). Posteriorněji je struna hřbetní stále zcela kompaktní (**Tab.7D**).

### 3.1.3. Pozdní fáze

Ve stádiu 25 v mediální části rostrální hlavy embrya stále pozorujeme vícevrstevný cylindrický epitel buněk předústního střeva (**Tab.8A, 8B a 9B**) a před strunou hřbetní posteriorní populaci prechordální destičky, která je jasně

mezenchymální (**Tab.8C**). Zdá se, že tato populace zde může být stále přítomna díky růstu a ohybu předního mozku, který zde vytváří značný volný prostor (**Tab.8A**). V anteriorní části hlavy kolem předústního střeva se však žádný podobný volný prostor pro mezenchymální buňky nenachází (**Tab.8A, 9A**), srv. popis v předchozím stádiu. Předpokládám, že mezenchymální buňky jak z této rostrální oblasti, tak i z prostoru před strunou hřbetní, byly vytlačeny do laterální části hlavy (**Tab.9C**), a to do oblasti za optickým váčkem (**Tab.8D, 8G**). Populace mezenchymálních buněk vyskytující se za optickým váčkem vytváří shluk, ve kterém můžeme postupně pozorovat zvětšující se otvory nebo cysty (**Tab.8E, 8F**). Těchto cyst se vytváří různý počet, jsou malé, oválného tvaru, ale netvoří nějaký konkrétní jednotný tvar či velikost (**Tab.9E-H**). Struna hřbetní je v této pozdní fázi už zcela kompaktní (**Tab.8A, 9D**).

Ve stádiu 26+ rostrálně stále pozorujeme předústní střevo, které se však v mediální části zmenšuje, a vzniká zde nový volný prostor (**Tab.10A a 10B**). Předústní střevo má ve své laterální části charakter cylindrického epitelu, na rozdíl od mediální části, kde je epitel spíše plochý (**Tab.11A**). I před strunou hřbetní nacházíme dobře definovanou posteriorní mezenchymální populaci buněk prechordální destičky (**Tab.10C, 11D**), ze které se nadále rozšiřují mezenchymální buňky do laterální části. V předchozím stádiu se v této laterální populaci vytvářelo několik malých cyst, které se v tomto stádiu sjednocují a vytvářejí dva větší váčky, nebo také pár hlavových kavit (**Tab.10D-J, 11E-J**). Tyto kavity však netvoří samostatné struktury, ale jsou ve své mediální části spolu propojené (**Tab.10H**). Na vnější stěny hlavových kavit je napojeno množství mezenchymálních buněk, a to hlavně v okolí optického váčku (**Tab.10F, 10G**). Hlavové kavity se také na vnějších stranách od sebe oddělují (**Tab.10E, 10I**) a vytváří okolo sebe silnou stěnu z mezenchymálních buněk (**Tab.10D, 10J**). Hlavové kavity se nachází na obou stranách hlavy, proto jsou tedy nazývány párové (**Tab.11B**). V každém páru je spodní kavita menší než kavita vrchní (**Tab.11C**).

## 3.2. Kostlín mexický (*Atractosteus tropicus*)

### 3.2.1. Raná fáze

Raná fáze u kostlína začíná ve stádiu 16. U kostlína se stejně jako u jesetera v jeho nejanteriornější části vznikající hlavy nachází nejprve pouze epiteliální předústní střevo a v posteriorní části předústního střeva i neurální kýl ležící nad ním (**Tab.12A a 12D**). Předústní střevo je po celé jeho délce tvořeno poměrně homogenním, vícevrstevným cylindrickým epitelem (**Tab.12E**), a v tomto stádiu se zatím žádné mezenchymální buňky v rostrální části hlavy nevyskytují. Více posteriorně můžeme pozorovat rozvolněný anteriorní konec struny hřbetní (**Tab.12D a 12G**) a mohli by představovat posteriorní populaci budoucí prechordální destičky (**Tab.12B**). Tyto buňky můžeme pozorovat anteriorně, pod neurálním kýlem (**Tab.12F a 12G**). Struna hřbetní je i u kostlína ve své posteriornější části celistvá a kompaktní (**Tab.12C**), na rozdíl od své nejanteriornější části, která je rozvolněná (**Tab.12G**).

### 3.2.2. Střední fáze

Ve stádiu 17 rostrálně můžeme vidět předústní střevo, které má jasně zřetelný vícevrstevný cylindrický epitel (**Tab.13A a 13F**), ovšem v jeho posteriornější části se začíná něco odehrávat. V této oblasti můžeme pozorovat mezenchymální buňky nad předústním střevem kolem rostrální neurální trubice (**Tab.13A**), ale nějaké zřetelné uvolňování zde pozorovatelné není. V mediální části nacházíme mezi předústním střevem a strunou hřbetní mezenchymální buňky, které nejspíše pochází ze struny hřbetní (**Tab.13B a 13C**). Tyto buňky z mediální části se rozšiřují opět do laterální části hlavy (**Tab.13C**), jako u jesetera. Ovšem z dorzální části hlavy také migrují buňky neurální lišty (Štundl, 2019) (**Tab.13B**). Ze struny hřbetní se stále uvolňují mezenchymální buňky (**Tab.13G**), které můžeme vidět jako posteriorní populaci prechordální destičky (**Tab.13E a 13H**). V posteriornější části těla je struna hřbetní už opět zcela kompaktní (**Tab.13D**).

Stádium 18 se vyznačuje značným vývojem jak celé hlavy, tak i populace buněk prechordální destičky. Předústní střevo se v této fázi vývoje začíná měnit na příchytne orgány (**Tab.14A a 14F**). Předústní střevo v anteriorní části tvoří vícevrstevný cylindrický epitel, zatímco posteriorněji na něj navazuje endodermální epitel v mediální části s jednovrstevným plochým epitelem (**Tab.14E a 14F**). V tomto stádiu také pozorujeme zvětšující se neurální trubici, která opět zatlačuje mezenchymální buňky před strunu hřbetní (**Tab.14B a 14G**). Mezenchymální buňky pozorujeme i anteriorně v prostoru nad předústním střevem (**Tab.14F**), ale zde je opět těžké rozlišit, jestli to jsou buňky prechordální destičky nebo neurální lišty. Před strunou hřbetní se vytvořila kompaktní populace buněk prechordální destičky (**Tab.14G**). Z této populace se buňky rozšiřují do laterální části hlavy (**Tab.14C**), jak už tomu bylo u předchozího stádia. Struna hřbetní je v této fázi už zcela kompaktní jak ve své posteriorní části (**Tab.14D**), tak se zdá být i ve své nejanteriornější (**Tab.14G**). Ovšem na imunohistochemických řezech se ukázalo, že struna hřbetní stále ve své anteriorní části kompaktní není (**Tab.15A a 15B**), ale uvolňují se z ní mezenchymální buňky. I na snímcích se samotným DAPI jasně rozlišíme jednotlivé epiteliální či mezenchymální struktury hlavy (**Tab.15D a 15E**). Před strunou hřbetní v mediální části vidíme velké množství mezenchymálních buněk, které se zase dají rozeznat díky nepřítomnosti bazální laminy (**Tab.16A, 16B**). Struna hřbetní je pak v její posteriorní části zase zcela kompaktní (**Tab.17A a 17B**). Buňky předústního střeva mají už bazální laminu, kterou můžeme pozorovat díky fibronektinu (**Tab.18A a 18C**), ale dobře viditelné to je i na snímcích s DAPI (**Tab.18B a 18D**).

Ve stádiu 18+ se předústní střevo dále vyvíjí na adhezivní orgán kostlína (**Tab.19A a 19E**) a vypadá podobně jako v předcházejícím stádiu. V posteriorní části střeva, těsně za předústním střevem, dochází ale k uvolňování mezenchymálních buněk, tedy možná k uvolňování anteriorní populace prechordální destičky (**Tab.19E a 19G**). Mezi předústní střevem a strunou hřbetní se stále více vtlačuje zvětšující se mozek, a volné místo zůstává pouze v oblasti před strunou hřbetní (**Tab.19E**), ale v oblasti nad předústním střevem můžeme pozorovat mezenchymální buňky, které

nemůžeme ale jasně definovat, odkud vznikají (**Tab.19A a 19E**). Struna hřbetní už má svůj anteriorní konec zcela uzavřený (**Tab.19F**), a kompaktní je tedy po celé své délce (**Tab.19D**). Prechordální destička zůstává jako taková stále před strunou hřbetní (**Tab.19F**) a i nadále se z ní rozšiřují buňky do laterální části hlavy (**Tab.19B a 19C**).

Ve stádiu 19 je předústní střevo (**Tab.20F**) společně s posteriorní částí prvostřeva ležící mezi ním a strunou hřbetní, kompaktní linií buněk, které sedí na bazální lamině (**Tab.20E**). V tomto stádiu je ještě méně prostoru v mediální části než tomu bylo doposud (**Tab.20E**), jehož příčinou je stále se zvětšující přední mozek. V mediální části zůstává už jen menší prostor před strunou hřbetní, v kterém stále leží posteriorní populace buněk prechordální destičky (**Tab.20G**). Z této populace se rozšiřují mezenchymální buňky do laterální části hlavy (**Tab.20B**), a začíná se zde zahušťovat populace těchto mezenchymálních buněk (**Tab.20A a 20C**). Struna hřbetní je zcela uzavřená a kompaktní po celé své délce (**Tab.20D a 20E**), což dále potvrzují imunohistochemická data (**Tab.21A a 21C**), a tedy už se z ní další mezenchymální buňky do populace prechordální destičky neuvolňují. V anteriorní části nad předústním střevem ovšem pozorujeme mezenchymální buňky (**Tab.21A**), které ale nemůžeme opět jasně rozlišit, odkud vznikly.

### 3.2.3. Pozdní fáze

Ve stádiu 20 už nemluvíme o předústním střevu, ale o jeho derivátu, a tím je adhezivní neboli cementový orgán (**Tab.22A a 22E**). V anteriorní oblasti hlavy převládá mozek, který stále vytváří úzký až těsný prostor mezi ním a prvostřevem (**Tab.22F**). Před strunou hřbetní se v mediální části už nevyskytuje kompaktní posteriorní populace buněk prechordální destičky (**Tab.22B**), ale je tam menší a roztroušená mezenchymální populace, která volně pokračuje až do laterální části hlavy a vytváří část hlavového mezenchymu (**Tab.22C**). Stále se ale v prostoru hlavy vyskytují i mezenchymální buňky neurální lišty (**Tab.22C**).

Ve stádiu 21 se cementový orgán jen nepatrně zvětšil (**Tab.23E**). Posteriorní populaci prechordální destičky můžeme stále v menším množství pozorovat před strunou hřbetní (**Tab.23C, 23D**). Z této populace se stále rozšiřují buňky do laterální části hlavy, kde se začínají značně zahušťovat (**Tab.23G**). I u kostlína můžeme pozorovat několik hlavových cyst v tomto laterálním hlavovém mezenchymu (**Tab.23B, 23D**), který se opět nachází v oblasti výskytu optického váčku (**Tab.23A**).

V následném stádiu 22 se stále nachází cementový orgán, který je teď rozmístěný po celé přední oblasti hlavy (**Tab.24E a 24G**). V této fázi není ani tak zajímavá mediální část hlavy, ale její laterální část, kde se za optickými váčky vytváří v hlavovém mezenchymu hlavová kavita (**Tab.24A a 24C**), která mohla vzniknout z hlavových cyst vyskytujících se ve stádiu 21. U kostlína se vytváří pouze jedna hlavová kavita na každé straně hlavy (**Tab.24B a 24D**), oproti dvěma u embrya jesetera. Tato kavita je ale podobně velká (**Tab.24H**) jako pár hlavových kavit, který

se nachází u jesetera (**např. Tab.10H**). Tyto buňky hlavových kavit se opět rozšiřují do oblasti v okolí optického váčku.

### 3.3. Bichir senegalský (*Polypterus senegalus*)

#### 3.3.1. Raná fáze

Raná fáze probíhá u bichira ve stádiu 20. Ve stádiu 20 pozorujeme v přední části jasně identifikovatelné epiteliální předústní střevo a nad jeho posteriorní částí neurální ploténku (**Tab.25A**). Předústní střevo tvoří opět kompaktní endodermální epitel (**Tab.25F**). V posteriorní části hlavy mezi předústním střevem a strunou hřbetní se více v laterální části nachází menší množství mezenchymálních buněk (**Tab.25B a 25C**), ale v nejanteriornější a mediální části se žádné mezenchymální buňky nenachází, pouze epitel (**Tab.25E**). Struna hřbetní je ve své zadnější části kompaktní, dokonce i její anteriorní konec se zdá být zatím uzavřený (**Tab.25D a 25G**).

#### 3.3.2. Střední fáze

Ve stádiu 21 je v anteriorní části hlavy stále předústní střevo těsně přilehlé k neurální ploténce (**Tab.26A**) a až v jeho posteriorní části se vytváří prostor pro mezenchymální buňky (**Tab.26E**). Předústní střevo je v mediální části embrya tvořeno vícevrstevným cylindrickým epitelem (**Tab.26F**), jenž přechází na jednovrstevný plochý epitel prvostřeva (**Tab.26E**). V neurální/posteriorní části předústního střeva lze pozorovat nesourodou populaci buněk, která se z něho uvolňuje a vytváří tak zřejmě anteriorní populaci buněk prechordální destičky (**Tab.26B, 26C**). V oblasti před strunou hřbetní se už v tomto stádiu vyskytuje populace mezenchymálních buněk, posteriorní populace prechordální destičky, která se uvolňuje ze struny hřbetní (**Tab.26G**). V posteriorní části hlavy je struna hřbetní zcela kompaktní (**Tab.26D**). Uvolňování buněk z anteriorní části struny hřbetní nám ukazuje i imunohistochemický řez, na němž je vidět jasná bazální lamina oddělující neurální ploténku od struny hřbetní a endodermálního prvostřeva zahrnující i rostrální předústní střevo (**Tab.27A a 27B**).

Ve stádiu 22 se v předústním střevu rozšiřuje dutina (**Tab.28A**), která je ve spojení se zbytkem prvostřeva (**Tab.28D**). Na posteriorním konci předústního střeva můžeme vidět větší shluk buněk anteriorní populace mezenchymu prechordální destičky (**Tab.28E**), přičemž na frontálním řezu můžeme pozorovat i jejich rozšiřování do laterální části hlavy (**Tab.28C**). Neurální ploténka je už uzavřená a vzniká tak nervová trubice, která zůstává podobná jako v předchozím stádiu (**Tab.28D**). Před strunou hřbetní je stále posteriorní populace mezenchymálních buněk prechordální destičky, která se dále rozšiřuje (**Tab.28B**). Tyto buňky se zřejmě uvolňují ze struny hřbetní (**Tab.28F**). Uvolňování buněk prechordální destičky z anteriorní části struny



hřbetní můžeme opět pozorovat i na imunohistochemickém řezu, na kterém je vidět její neukončená anteriorní část, jež je rozvolněná oproti své zbylé části, kde můžeme pozorovat bazální laminu (**Tab.29B a 29D**). Tyto mezenchymální buňky jsou rozšířené až k posteriornímu konci předústního střeva, kde můžeme vidět hustou populaci mezenchymálních buněk (**Tab.29A a 29C**). Tento řez byl proveden u staršího stádia, a to konkrétně stádium 22+.

Ve stádiu 23 dochází k přeměně předústního střeva na cementový orgán (**Tab.30A**). V jeho mediální části na posteriorním konci stále dochází k uvolňování mezenchymálních buněk (**Tab.30A, 30C**), a to dokonce z větší oblasti než tomu bylo v předchozím stádiu (**Tab.30F**). V hlavové oblasti před strunou hřbetní se také stále nachází mezenchymální buňky, tvořící posteriorní populaci prechordální destičky (**Tab.30G**). Ovšem tato populace je už pouze v této oblasti, jak tomu bylo u předchozích zkoumaných druhů, neboť i u bichira dochází k růstu předního mozku, který přiléhá k těsně k endodermu prvostřeva (**Tab.30E**). Před strunou hřbetní můžeme vidět v předním mozku ohyb, a tak možná vzniká větší prostor i pro posteriorní populaci buněk prechordální destičky (**Tab.30G**). Struna hřbetní je v této fázi už uzavřená a kompaktní, tedy další buňky se z ní už neuvolňují (**Tab.30G, 30D**).

### 3.3.3. Pozdní fáze

Pozdní fáze začíná stádiem 24. Oproti předchozímu došlo u embrya k výrazným změnám v oblasti hlavy. Předústní střevo se přeměnilo na párový cementový orgán, který má v sobě obrovské dutiny (**Tab.31A**). Přední mozek se ještě výrazněji zvětšil a protáhl, a tak prvostřevo a mozek stále přiléhají v určité oblasti těsně k sobě (**Tab.31E a 31F**). Mezi přední a zadní částí mozku pozorujeme zúžení, a tak vzniká větší prostor pro posteriorní populaci buněk prechordální destičky, která nadále leží před strunou hřbetní (**Tab.31G**). Z této populace buněk se začínají rozšiřovat mezenchymální buňky do laterální části hlavy (**Tab.31B a 31C**). Struna hřbetní je stejně jako v předchozím stádiu už uzavřená a kompaktní (**Tab.31D, 31G**).

Ve stádiu 25 můžeme v nejanteriornější části hlavy vidět pár cementových orgánů po stranách hlavy (**Tab.32A**). Před strunou hřbetní se nachází stále menší posteriorní populace buněk prechordální destičky (**Tab.32B, 32E a 32H**), z které se nadále rozšiřují mezenchymální buňky do laterální části hlavy a stávají se tak součástí hlavového mezenchymu (**Tab.32C a 32D**). Velké množství těchto mezenchymálních buněk je nahuštěno v okolí optického váčku, který je párový (**Tab.32F**). Struna hřbetní, ale i předústní střevo jsou už zcela kompaktní, jejich buňky tedy sedí na bazální lamině, jak nám ukazuje imunohistochemický řez, který vykazuje jasnou bazální laminu mozku a struny hřbetní (**Tab.33A a 33C**), a to i na jejím anteriorním konci (**Tab.33B a 33D**).

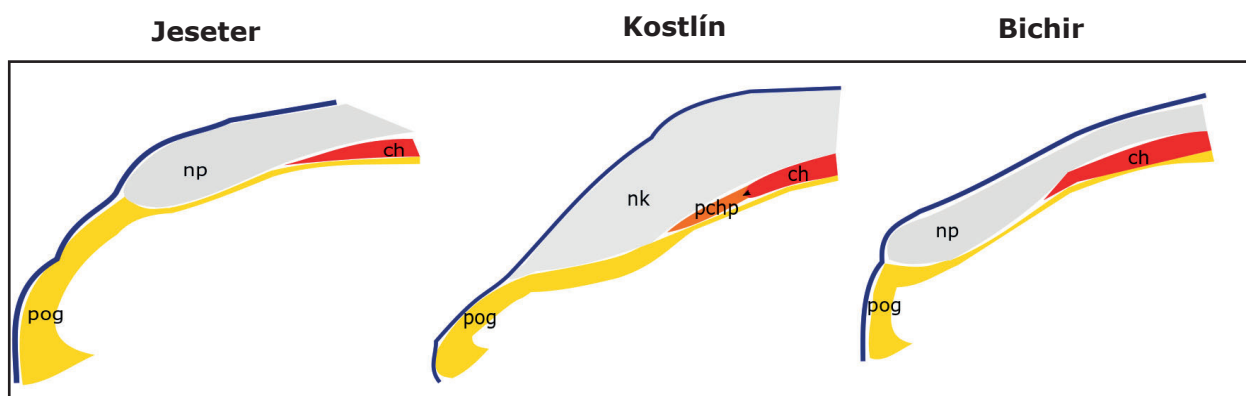
Poslední stádium, tedy 26, je podobné předchozímu. Cementové orgány jsou otevřené ven (**Tab.34E**) a mohou tak produkovat potřebný hlen pro uchycení embrya na substrátu či rostlině (Minařík, 2017). V oblasti před strunou hřbetní vidíme stále

posteriorní populaci buněk prechordální destičky (**Tab.34A, 34B a 34H**), a i nadále se z ní rozšiřují mezenchymální buňky do laterální části hlavy (**Tab.34D**). V laterální části hlavy dochází k velkému nahuštění mezenchymálních buněk, a to hlavně v oblasti optického vřetku (**Tab.34E, 34F**). Ovšem nepozorujeme zde žádné hlavové cysty či z nich tvořící se hlavové kavity, jak tomu bylo u embrya jesetera či kostlína.

### 3.4. Shrnutí výsledků

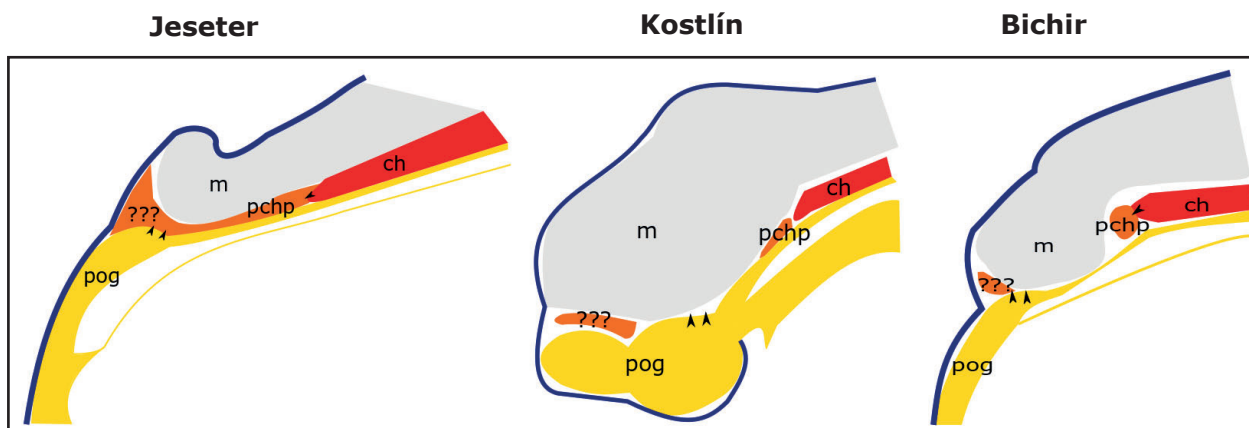
#### 3.4.1. Raná fáze

Raná fáze vývoje rostrální oblasti hlavy se vyznačuje pouze přítomností epiteliálního předústního střeva a ektodermu. V anteriorní oblasti se tedy původně nenachází žádné mezenchymální buňky, které by ukazovaly na přítomnost klasické prechordální destičky. V posteriorní části je vytvořena struna hřbetní, která je u jesetera a bichira spíše uzavřená, ale u kostlína se z ní už uvolňují první mezenchymální buňky.



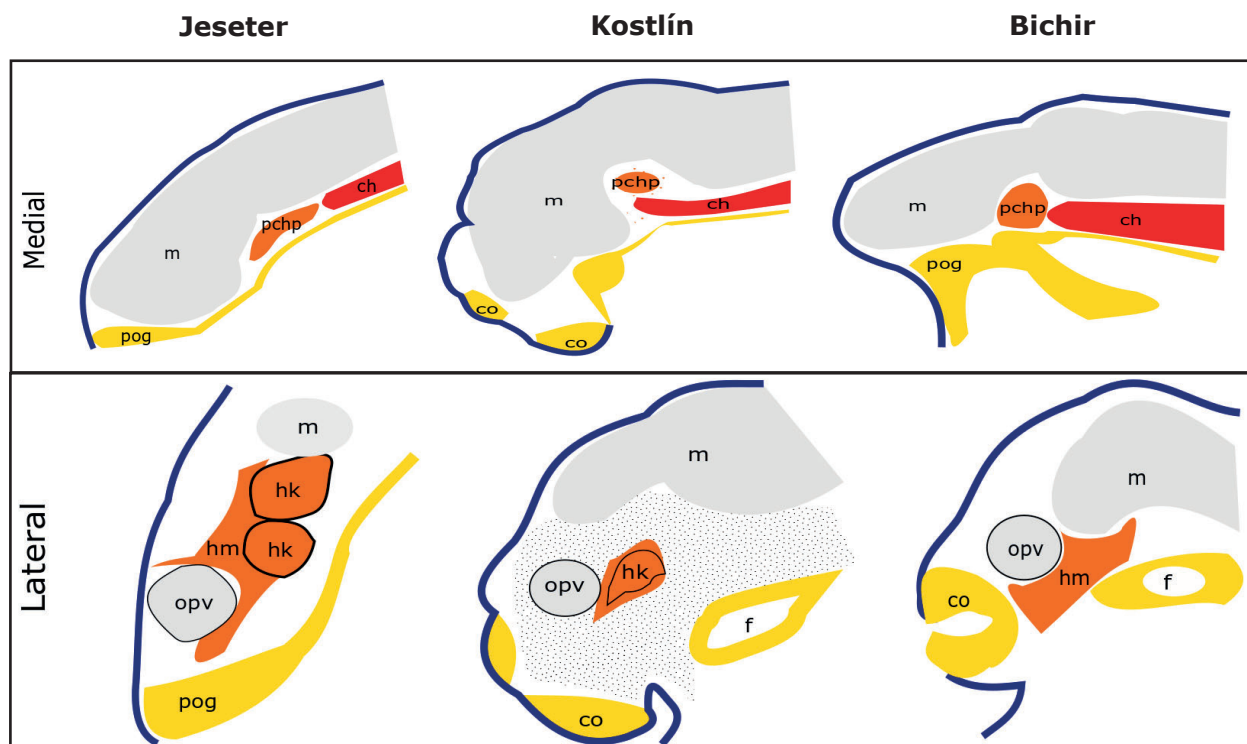
#### 3.4.2. Střední fáze

Ve střední fázi se začínají objevovat mezenchymální buňky, které se uvolňují z posteriorního konce předústního střeva v místě kolem rostrálního konce mozku, ale také z oblasti kolem anteriorního konce struny hřbetní, a vytvářejí tak společně populaci buněk, kterou můžeme označit jako klasickou prechordální destičku. Prechordální destička má tedy duální embryonální původ - její rostrální část vzniká epitelo-mezenchymální tranzicí přímo z endodermu, zatímco její posteriorní část epitelo-mezenchymální tranzicí či rozvolněním anteriorního konce struny hřbetní. Mezenchymální buňky se původně vyskytují spíše v mediální části, a později se rozšiřují do laterální části hlavy podle toho, jak jim to umožňuje vyvíjející se přední mozek.



### 3.4.3. Pozdní fáze

V pozdní fázi se v mediální oblasti předústní střevo či spíše už jeho deriváty, adhezivní orgány, zmenšují. Naopak mezenchymální buňky z oblasti struny hřbetní se více rozšiřují do laterální části hlavy, kde se shlukují v okolí optického váčku. V tomto mezenchymu se u jesetera a kostlína vytvářejí nejprve hlavové cysty, a později se u jesetera vytváří jeden pár hlavových kavit, zatímco u kostlína pouze jedna větší hlavová kavita. Bichir nevytváří žádné hlavové kavity, ale o to má větší hustotu mezenchymálních buněk v této oblasti.





## Seznam zkratek

co – cementový orgán

ekt – ektoderm

end - endoderm

f – dutina prvostřeva

hk – hlavové kavity

hm – hlavový mezenchym

ch – struna hřbetní

m – mozek

nk – neurální kýl

np – neurální ploténka

nt – neurální trubice

opv – optický váček

pchp – prechordální destička

pog – předústní střevo

s – somity

sr - srdce

vž - vnější žábry

žv – žloutkový váček

## **4. Tabule**

**Tabule 1:** Raná fáze vývoje prechordální destičky u jesetera, st. 20

**A-D** - frontální řezy, nakrájel a vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - řez anteriorní částí hlavy

**B** - detail snímku A, žluté tečky ohraničují hranici mezi posteriorní částí předústního střeva a neurální ploténkou

**C** - řez v oblasti mezi předústním střevem a strunou hřbetní

**D** - detail snímku C, černé tečky znázorňují těsnou hranici mezi prvostřevem a neurální ploténkou

**E-H** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - mediální průřez hlavou embrya

**F** - detail snímku E, žluté tečky znázorňují hranici mezi předústním střevem a vnějším ektodermem

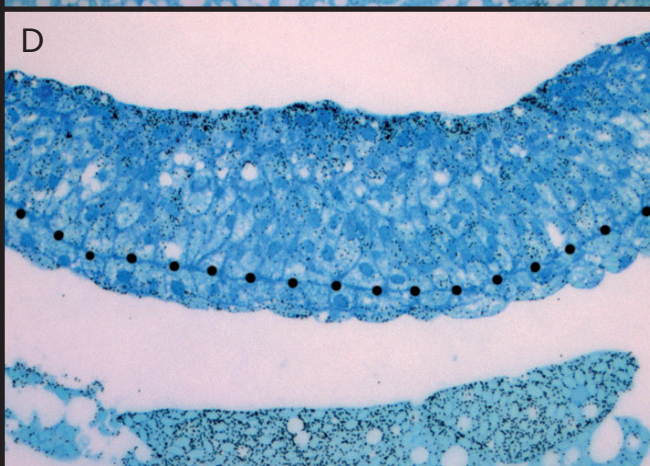
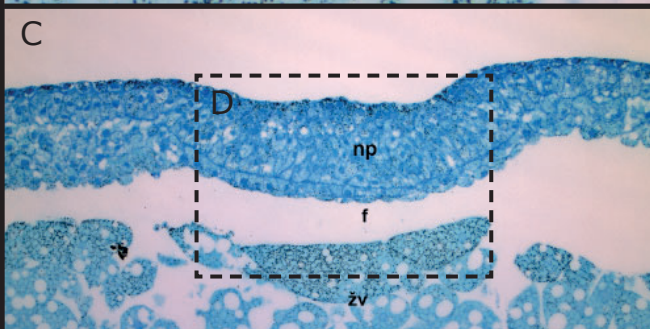
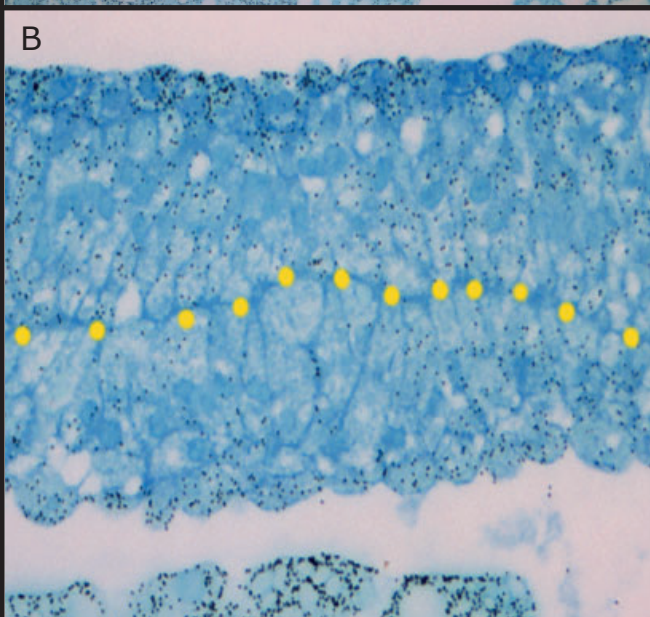
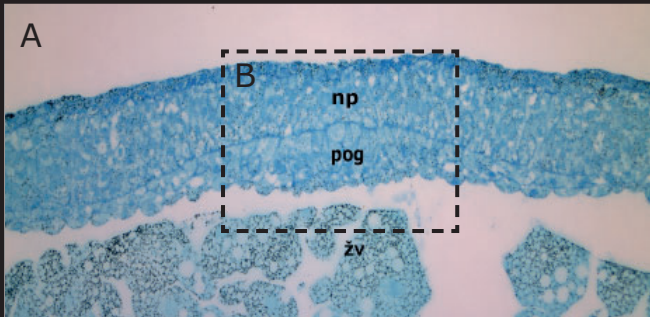
**G** - detail snímku E, žluté tečky znázorňují hranici mezi endodermem prvostřeva a neurální ploténkou

**H** - detail snímku E, žluté tečky znázorňují linii endodermu prvostřeva a červené tečky ohraničují strunu hřbetní

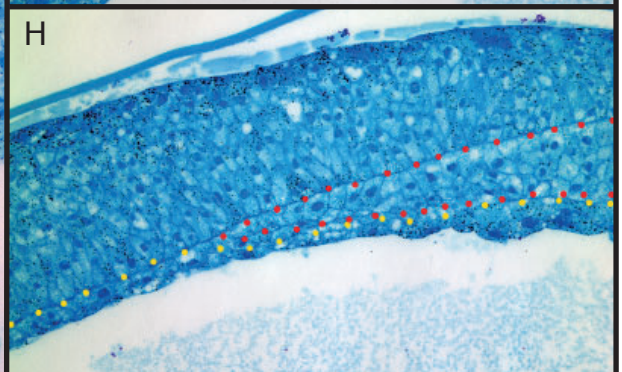
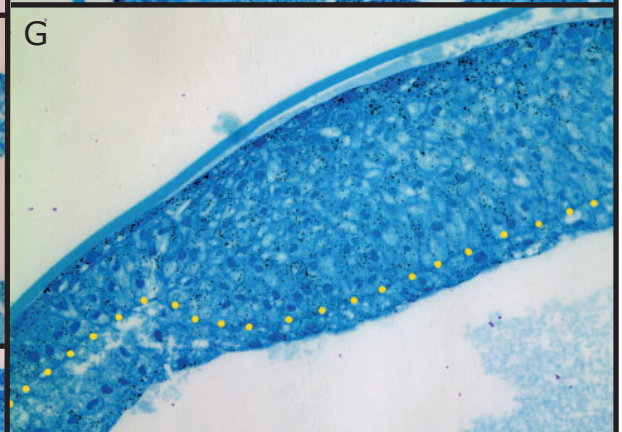
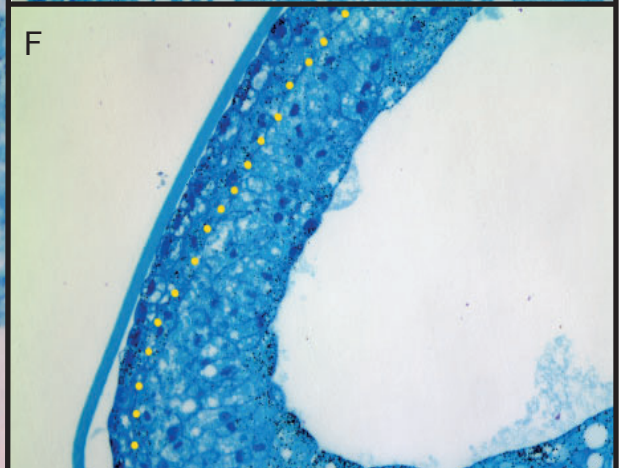
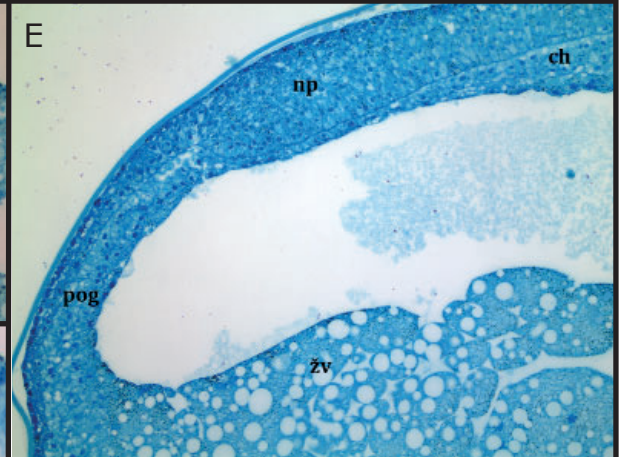
# Raná fáze

st. 20

## Frontální řez



## Mediální řez



**Tabule 2:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u jesetera, st. 21+

**A-D** - frontální řezy, nařezal a vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - anteriorní část hlavy, žluté šipky znázorňují uvolňování buněk z posteriorní/neurální části předústního střeva

**B** - řez částí hlavy ležící mezi předústním střevem a strunou hřbetní

**C** - detail obrázku B, hvězdička znázorňuje mezenchymální buňky posteriorní populace prechordální destičky

**D** - přední část struny hřbetní

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - pohled na mediální řez hlavou embrya

**F** - detail obrázku E, žluté šipky znázorňují možné uvolňování buněk z posteriorní části předústního střeva, černé tečky ohraničují hranici ektodermu/neurální ploténky a předústního střeva

**G** - detail obrázku E, červená šipka označuje uvolňování buněk posteriorní prechordální destičky ze struny hřbetní, černé tečky označují spodní část neurální ploténky a žluté hranici prvostřeva

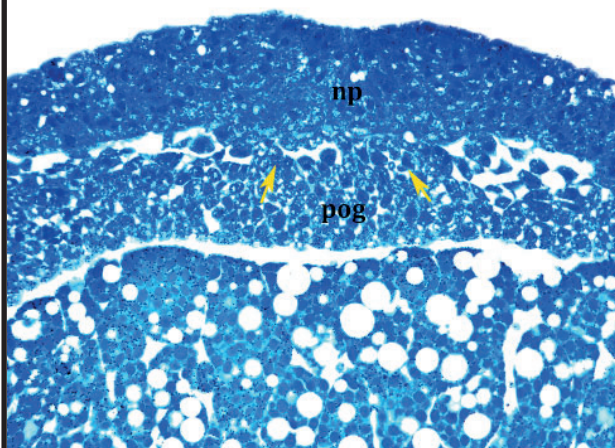


# Střední fáze

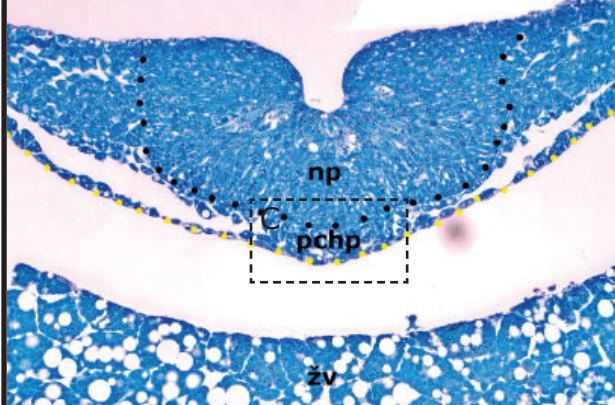
st. 21+

## Frontální řez

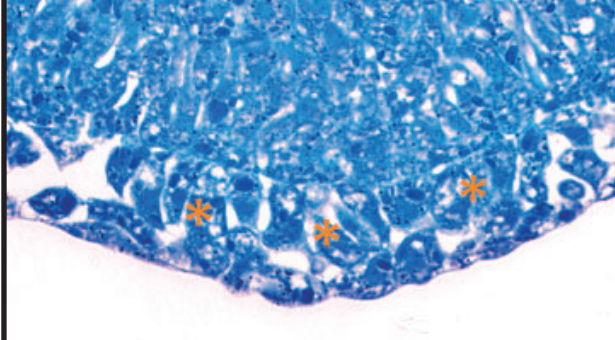
A



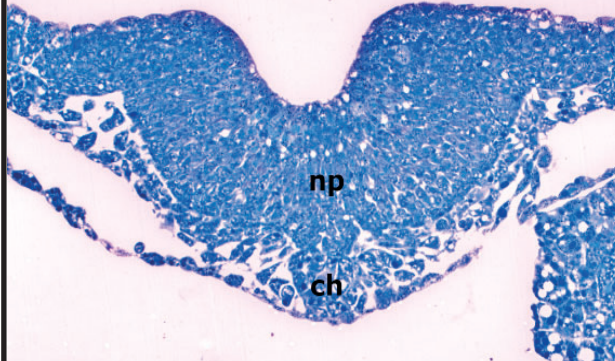
B



C

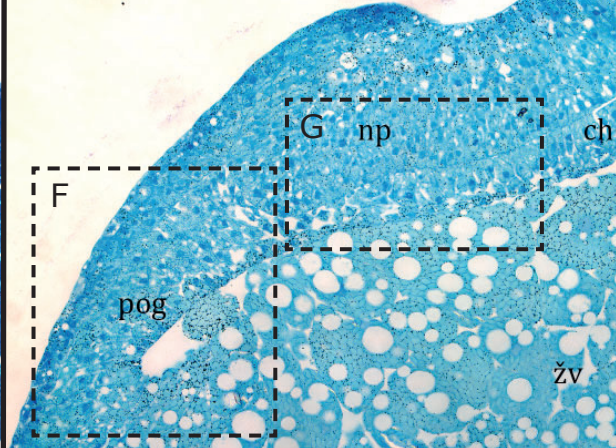


D

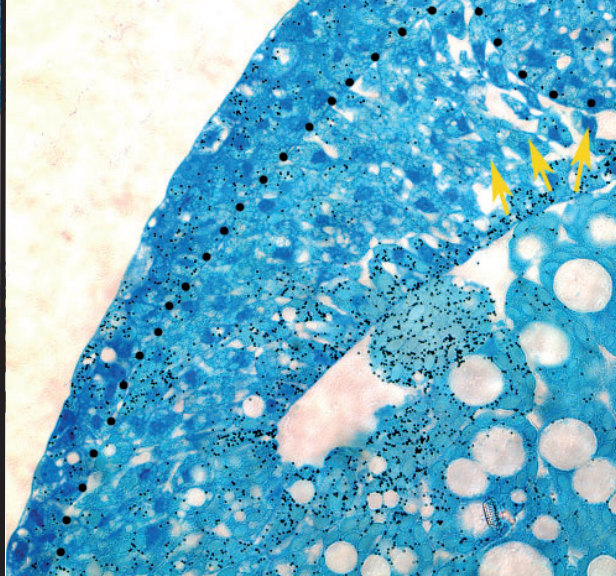


## Mediální řez

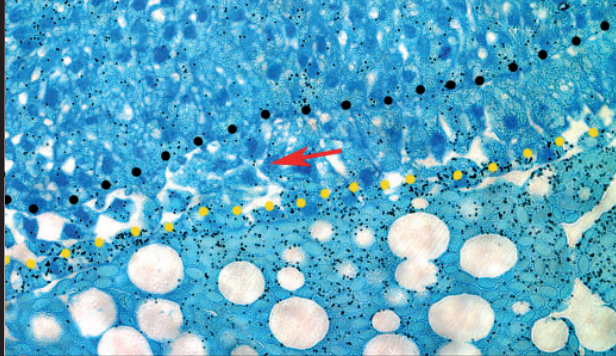
E



F



G



**Tabule 3:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u jesetera, st. 22+

**A-E** - frontální řezy, nařezal a vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - řez anteriorní částí hlavy, zobrazující neurální ploténku a posteriorní předústní střevo

**B** - detail obrázku A, žluté šipky ukazují uvolňování buněk z předústního střeva

**C** - řez znázorňuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky, ležící mezi neurální ploténkou (černé tečky) a prvostřevem (žluté tečky)

**D** - detail obrázku C, konkrétně prechordální destičky

**E** - řez v anteriorní oblasti struny hřbetní

**F-I** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**F** - mediální řez oblastí hlavy

**G** - detail obrázku F, žluté tečky označují předústní střevo a žluté šipky ukazují místo možného uvolňování buněk z něj, černé tečky ohraničují neurální ploténku

**H** - mediální řez zadní částí hlavy, černé šipky ohraničují spodní část neurální ploténky, žluté svrchní část prvostřeva a červené strunu hřbetní, červená šipka pak ukazuje směr uvolňování buněk ze struny hřbetní

**I** - detail obrázku H, oranžové hvězdičky ukazují mezenchymální buňky prechordální destičky

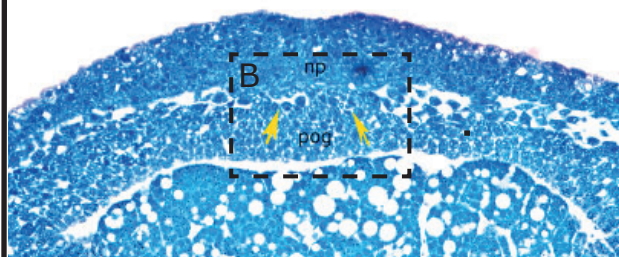


# Střední fáze

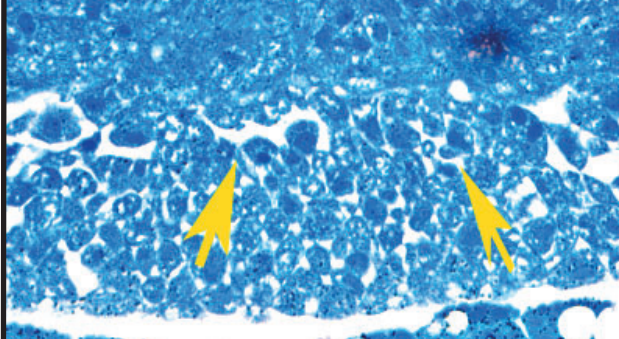
st. 22+

## Frontální řez

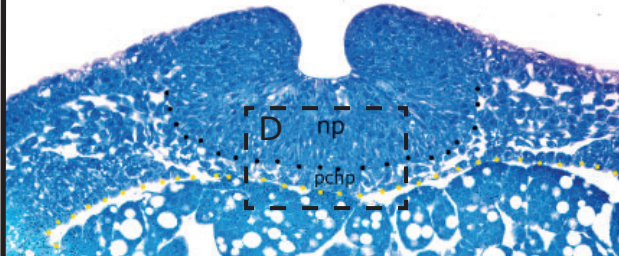
A



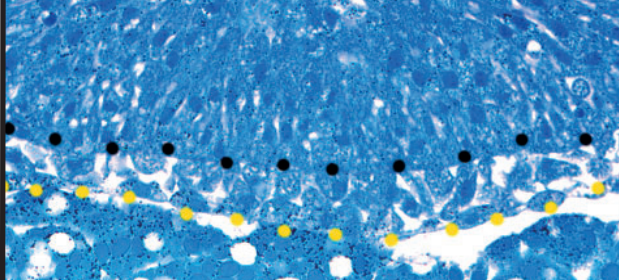
B



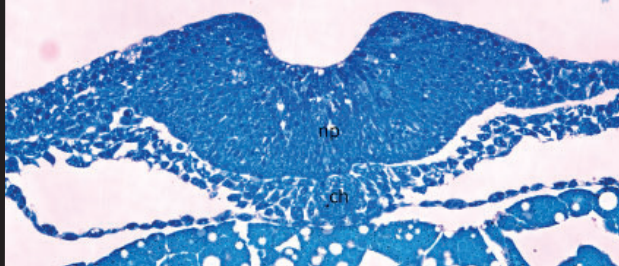
C



D

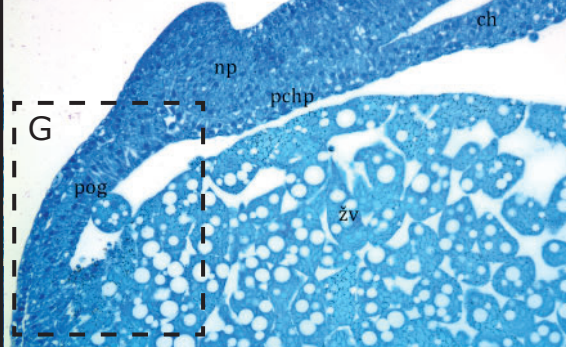


E

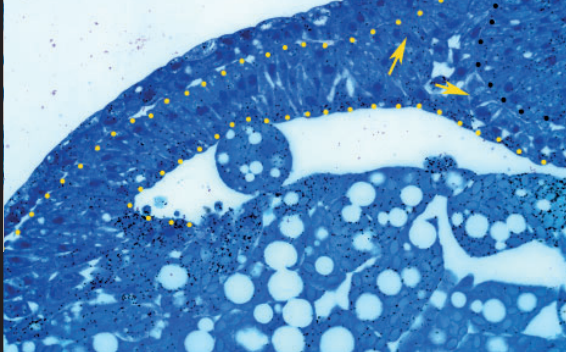


## Mediální řez

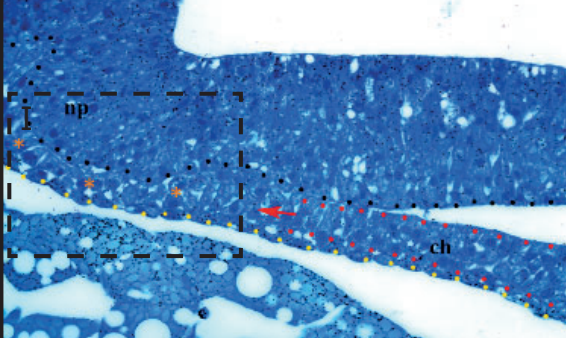
F



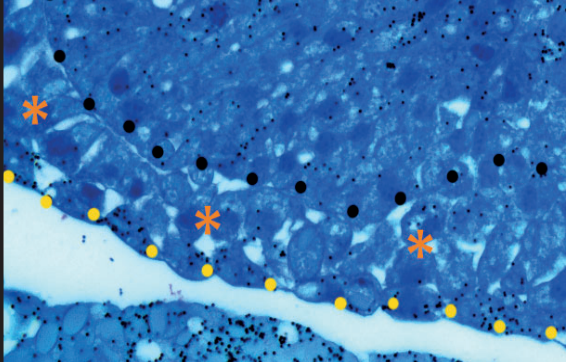
G



H



I





**Tabule 4:** Střední fáze u jesetera, rozdíl mezi epiteliálními a mezechymálními buňkami zobrazen pomocí protilátky **Fibronectin** a **DAPI**, st. 22+

**A-B** - histologický frontální řez, pro lepší orientaci na imunohistochemickém řezu, nařezal a vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - řez v oblasti mezi předústním střevem a strunou hřbetní

**B** - detail obrázku A, černé tečky ohraničují spodní část neurální ploténky a žluté svrchní část prvostřeva

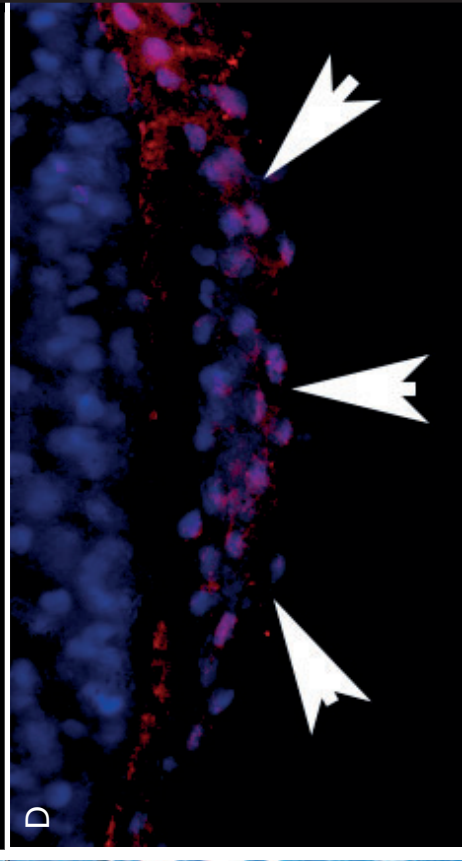
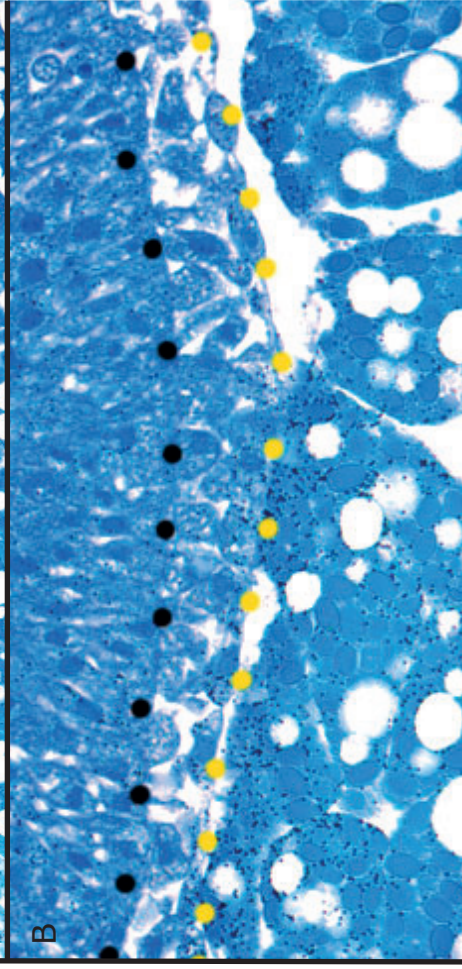
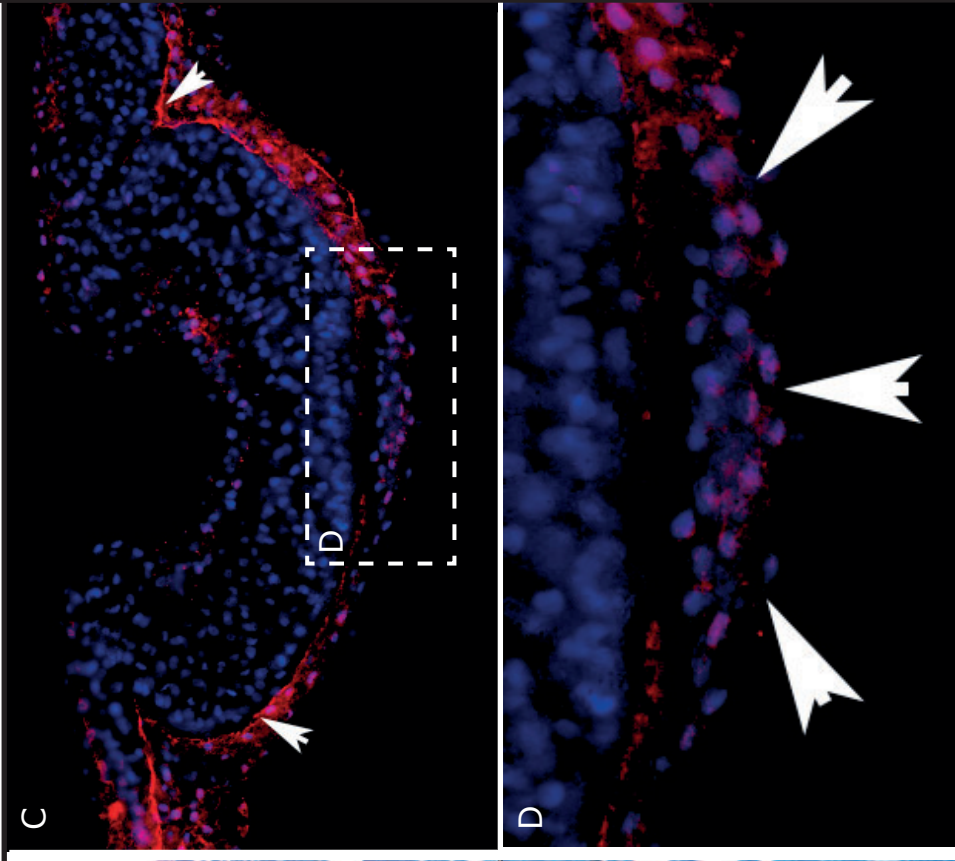
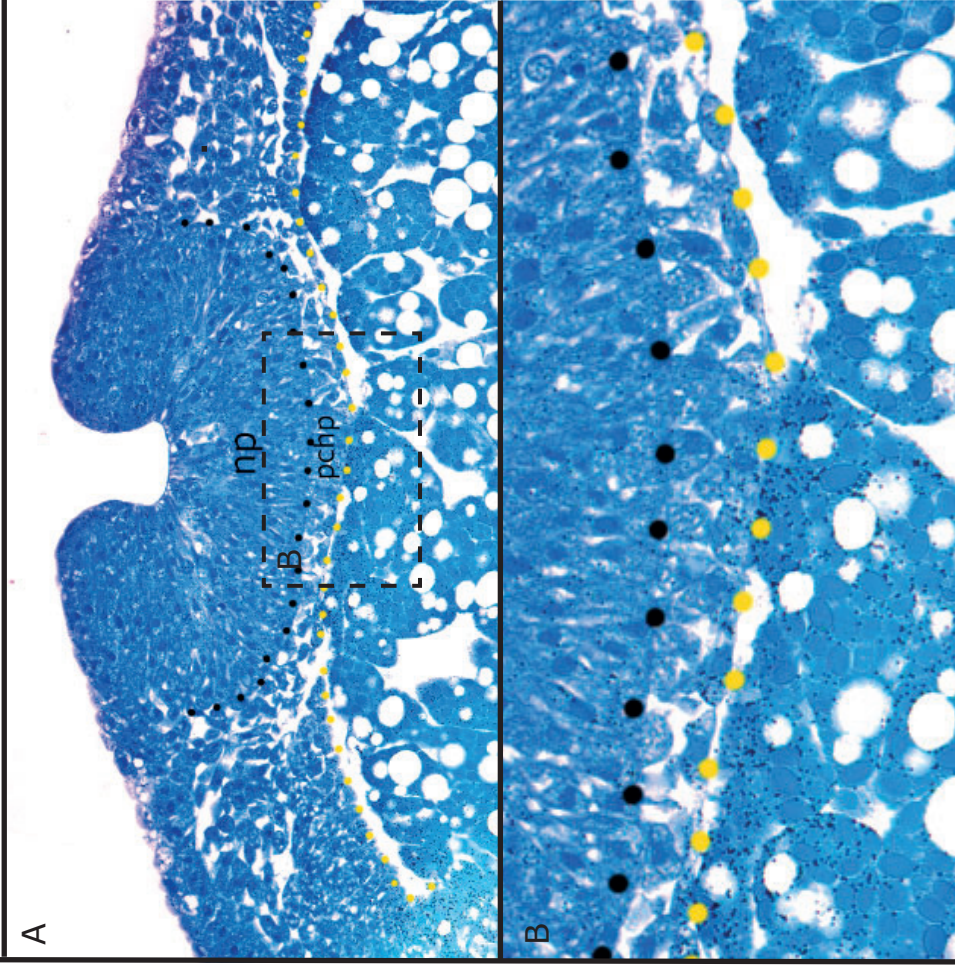
**C-D** - imunohistochemický frontální řez

**C** - řez v oblasti mezi předústním střevem a strunou hřbetní, bílé šipky znázorňují bazální laminu buněk označených pomocí červené protilátky fibronektinu

**D** - detail obrázku C, bílé šipky zobrazují mezenchymální buňky obarvené také pomocí červené protilátky fibronektinu

Střední fáze

st. 22+



**Tabule 5:** Střední fáze u jesetera, exprese genu *Gsc* v oblasti předústního střeva, st. 22 a 22+

**A-C** - *In situ* hybridizace genu *Gsc*, hybridizoval a vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - whole-mount embryo vyfocené z dorzální strany, hlava směřuje nahoru

**B** - detail obrázku A, žluté tečky ohraničují předústní střevo a černá šipky směřuje na expresi genu *Gsc* v posteriorní části předústního střeva

**C** - stejný snímek jako obrázek B, bílé tečky představují jádra buněk obarvené protilátkou DAPI

**D-F** - *In situ* hybridizace genu *Gsc*, hybridizoval a vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

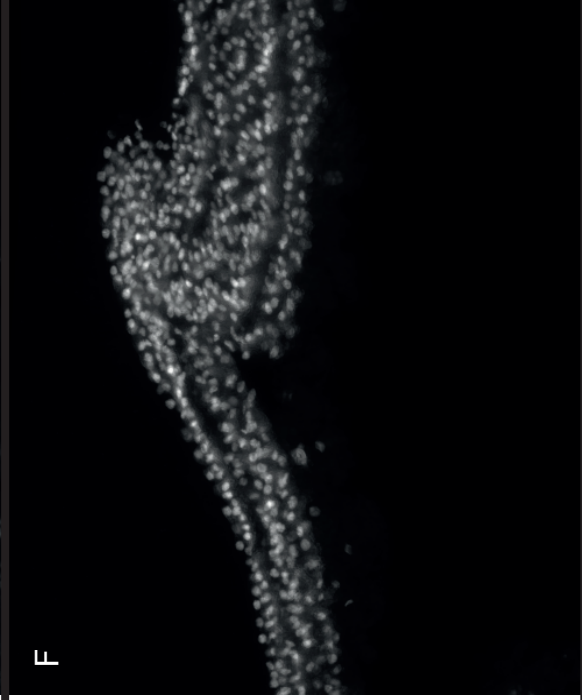
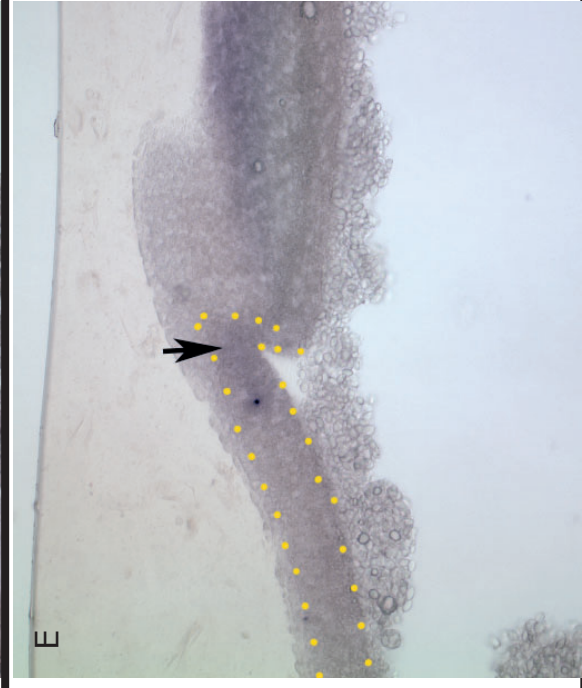
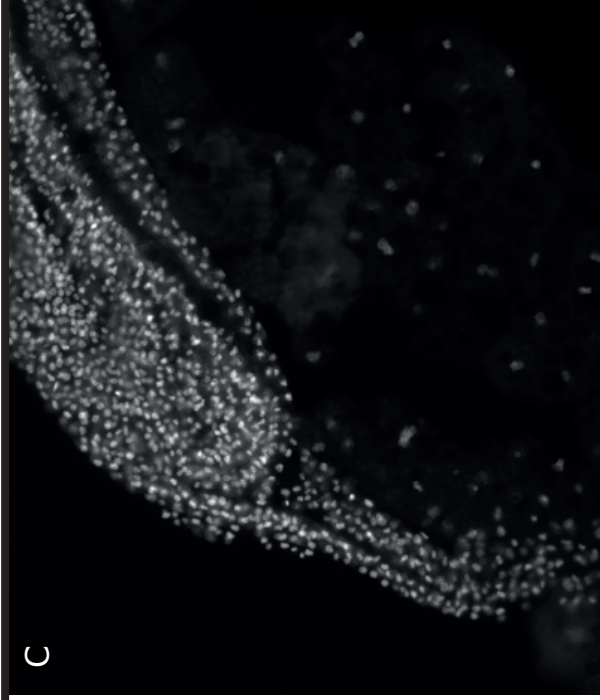
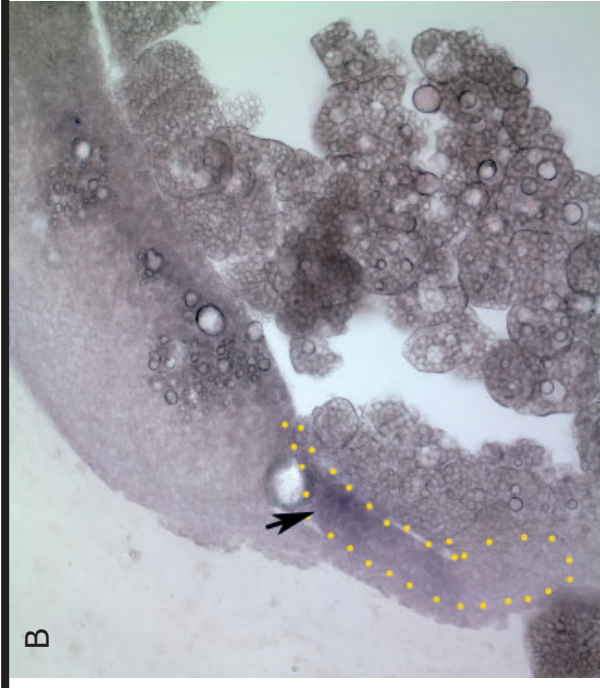
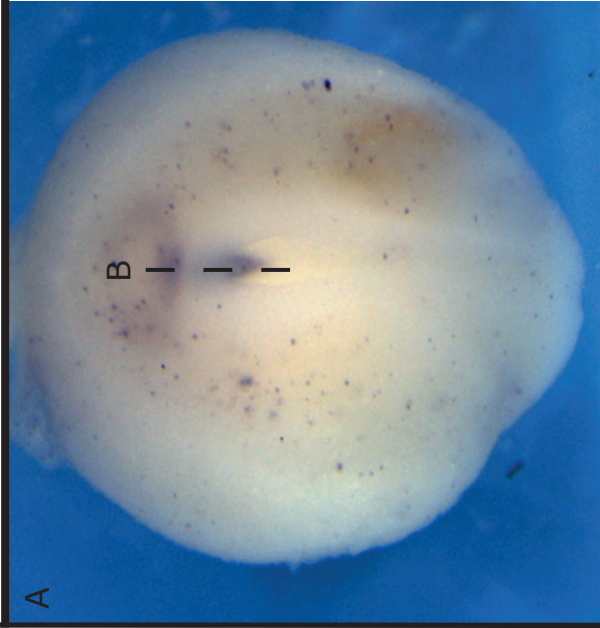
**D** - whole-mount embryo vyfocené z dorzální strany, hlava směřuje nahoru

**E** - detail obrázku D, žluté tečky ohraničují předústní střevo a černá šipka směřuje na expresi genu *Gsc* v posteriorní části předústního střeva

**F** - stejný snímek jako obrázek E, bílé tečky představují jádra buněk obarvené protilátkou DAPI



Střední fáze



st. 22

st. 22+

**Tabule 6:** Střední fáze u jesetera, exprese genu *Gsc* a *Twist1* v oblasti předústního střeva, st. 23

**A-C** - *In situ* hybridizace genu *Gsc*, hybridizoval Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - whole-mount embryo vyfocené z dorzální strany, hlava směřuje nahoru (vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.)

**B** - detail obrázku A, žluté tečky ohraničují předústní střevo a černá šipky směřuje na expresi genu *Gsc* v posteriorní části předústního střeva

**C** - stejný snímek jako obrázek B, bílé tečky představují jádra buněk obarvené protilátkou DAPI

**D-F** - *In situ* hybridizace genu *Twist1*, hybridizoval a vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**D** - whole-mount embryo vyfocené z dorzální strany, hlava směřuje nahoru

**E** - detail obrázku D, žluté tečky ohraničují předústní střevo a černá šipky směřuje na expresi genu *Twist1* v posteriorní části předústního střeva

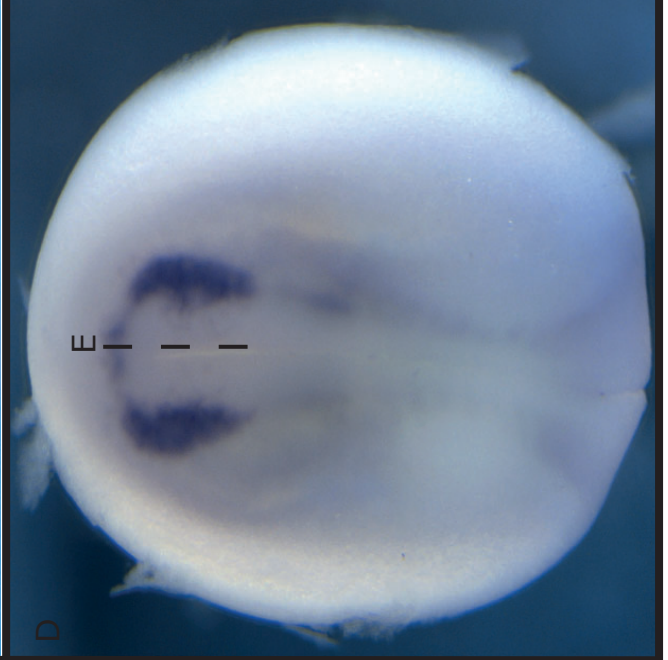
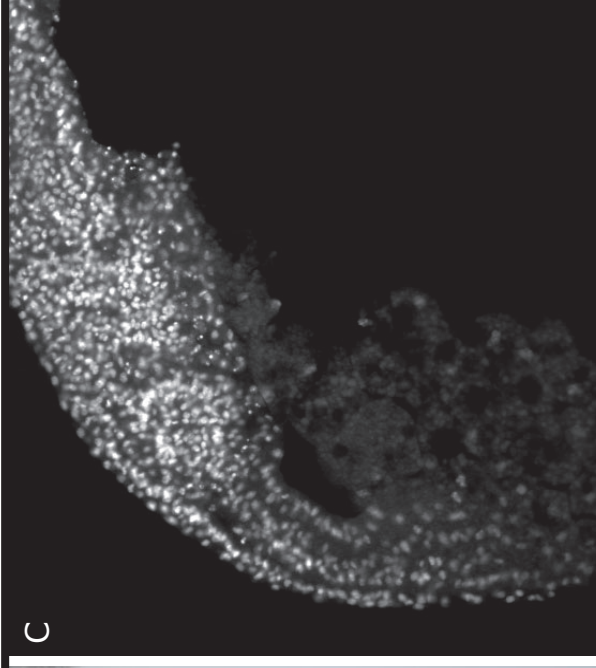
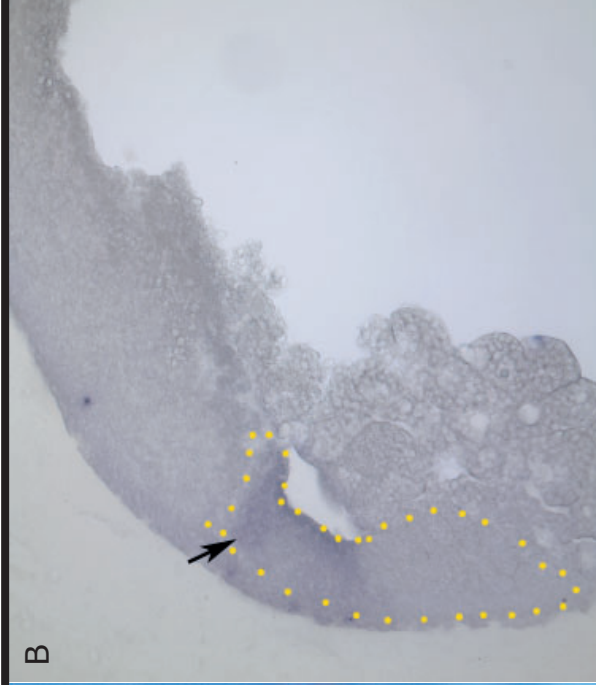
**F** - stejný snímek jako obrázek E, bílé tečky představují jádra buněk obarvené protilátkou DAPI



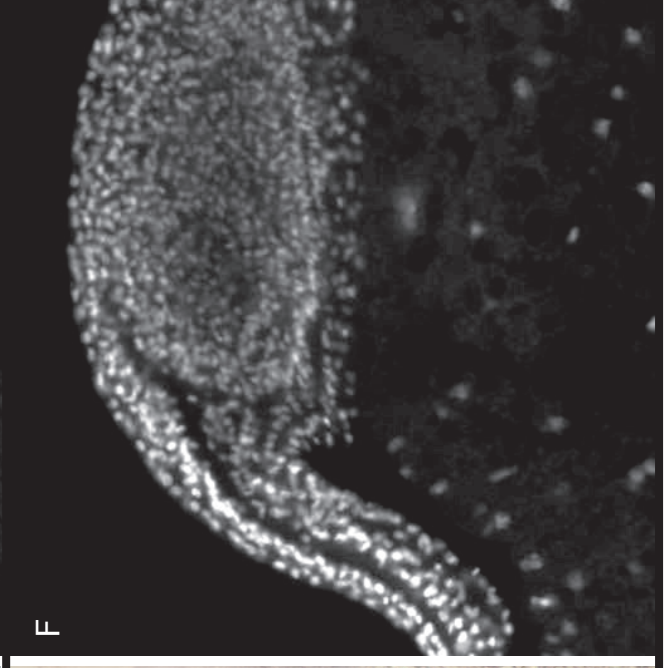
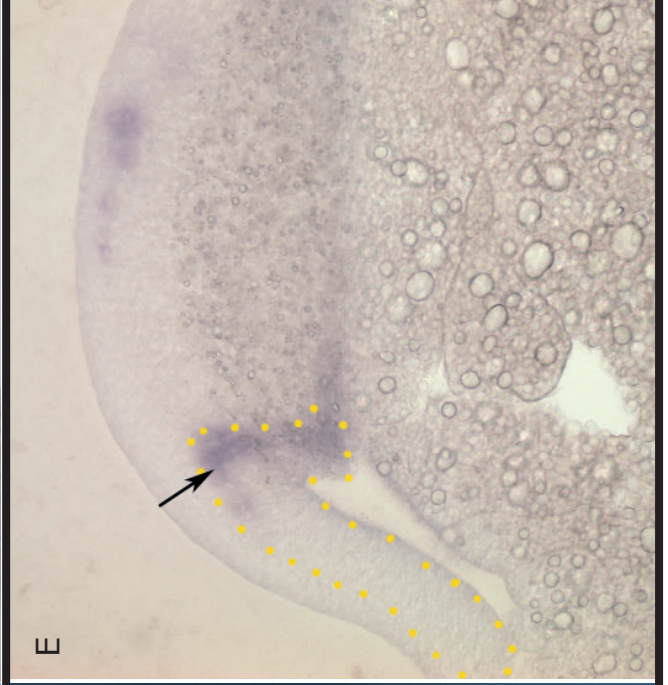
Střední fáze - st. 23



*Gsc*



*Twist1*





**Tabule 7:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u jesetera, st. 24

**A-D** - frontální řezy

**A** - nejanteriornější část hlavy, v níž pozorujeme v těsné blízkosti vnější ektoderm a předústní střevo

**B** - průřez částí hlavy, jež se nachází těsně před strunou hřbetní

**C** - detail snímku B, oranžové šipky ukazují směr rozšiřování mezenchymálních buněk z prechordální destičky, zelené šipky směr migrace buněk neurální lišty; černé tečky pak ukazují spodní hranici neurální trubice a žluté svrchní hranici prvostřeva

**D** - průřez anteriorní částí struny hřbetní

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - mediální řez oblastí hlavy embrya

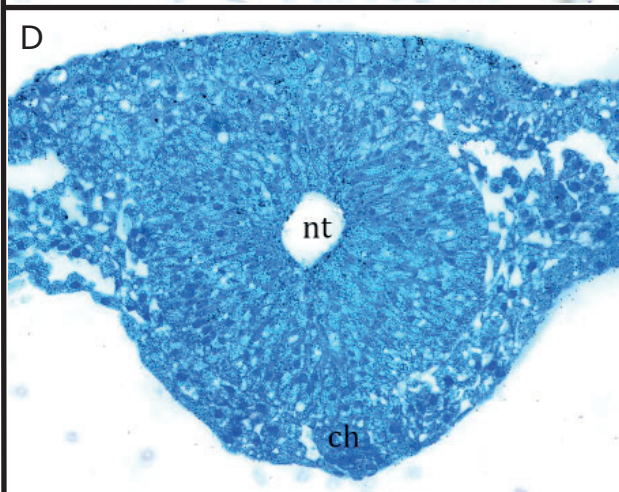
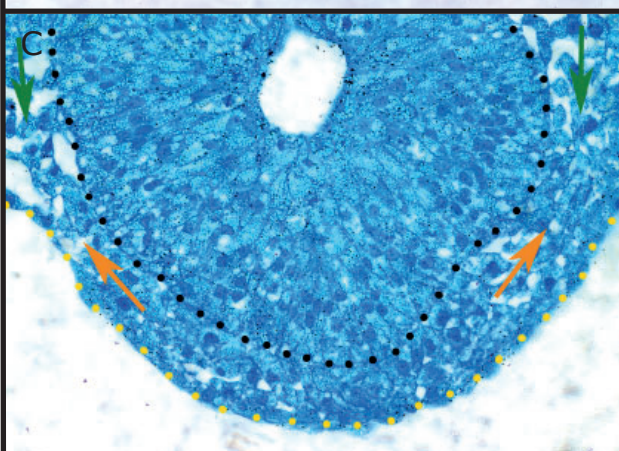
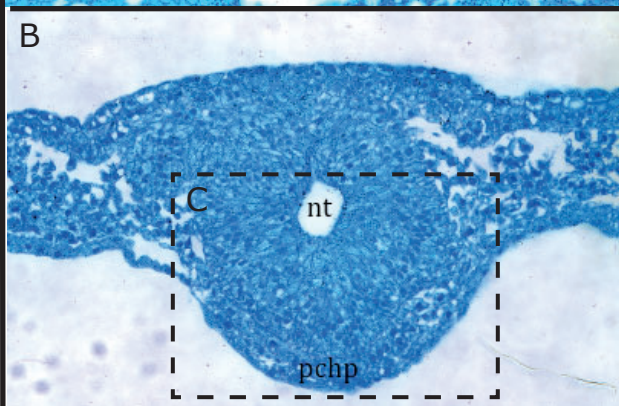
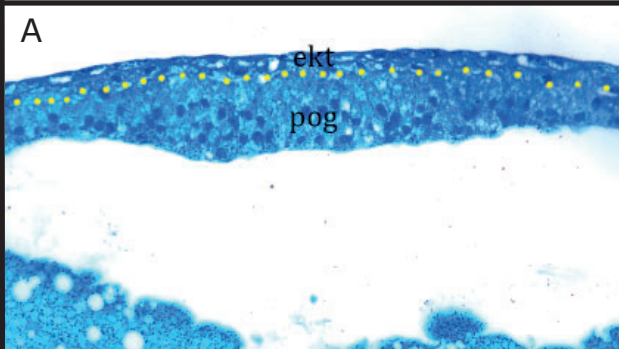
**F** - detail snímku E, žluté tečky ohraničují linii předústního střeva

**G** - detail snímku E, červené tečky ohraničují strunu hřbetní, oranžové posteriorní populaci prechordální destičky a černé tečky úzkou linií mezi neurální trubicí a prvostřevem

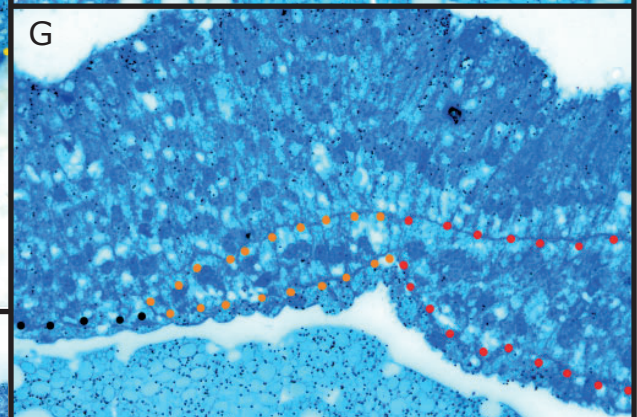
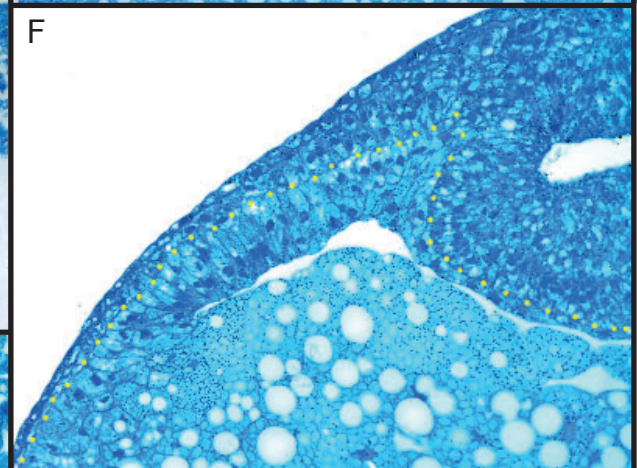
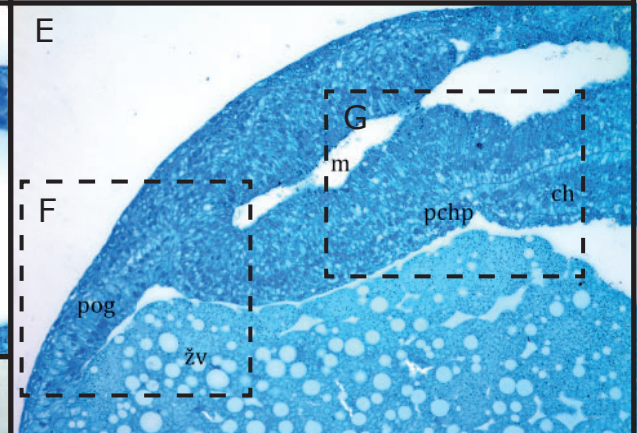
# Střední fáze

st. 24

## Frontální řez



## Mediální řez



**Tabule 8:** Pozdní fáze vývoje prechordální destičky u jesetera, st. 25

**A-C** - sagitální řezy v mediální části, hlava směřuje doleva

**A** - průřez hlavy v mediální části

**B** - detail snímku A, žluté tečky ohraničují předústní střevo

**C** - detail snímku A, oranžová hvězdička označuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky

**D-G** - sagitální řezy v laterální části, hlava směřuje doleva

**D a G** - laterální řez v oblasti optického váčku

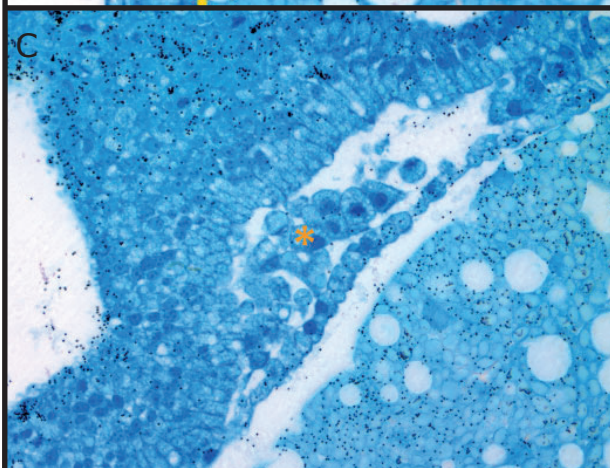
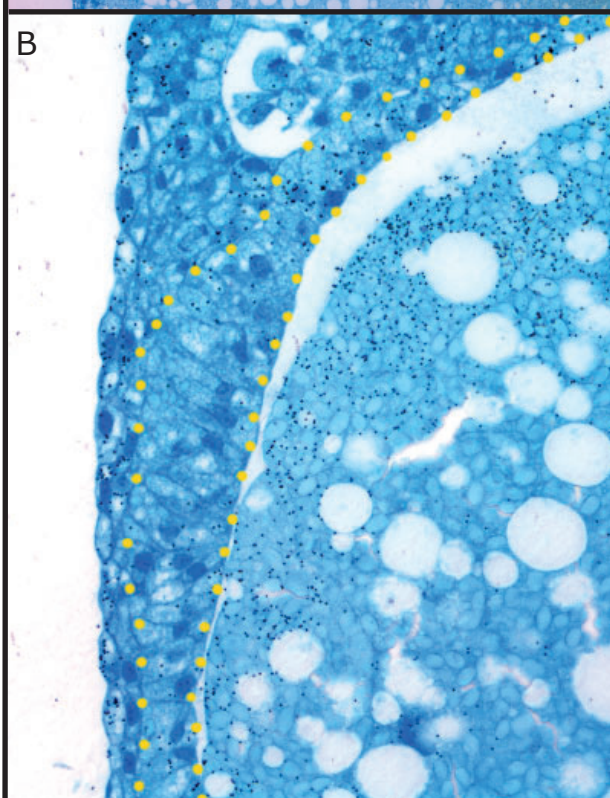
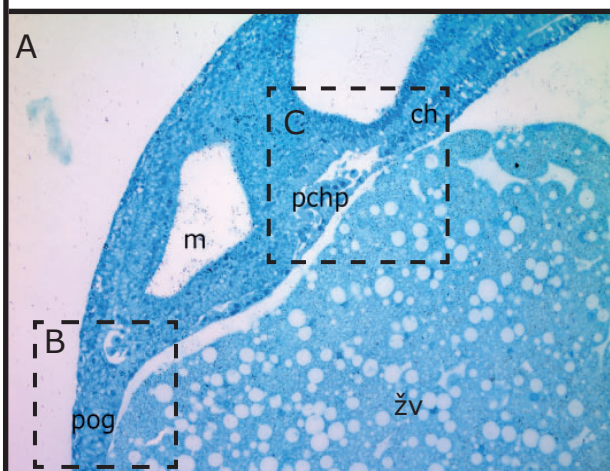
**E a F** - detail snímku D a G, oranžové šipky ukazují cysty vznikající v hlavovém mezenchymu



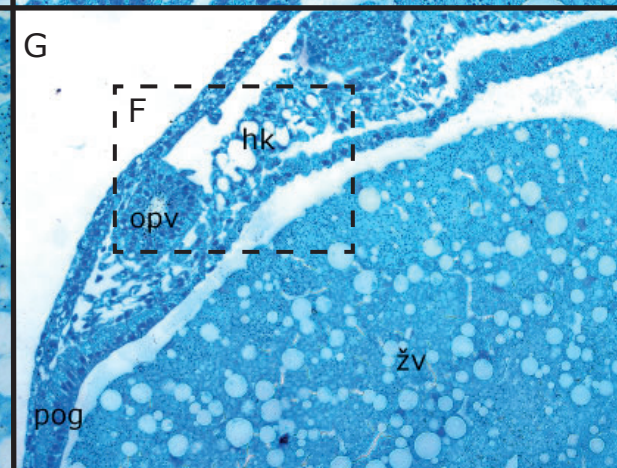
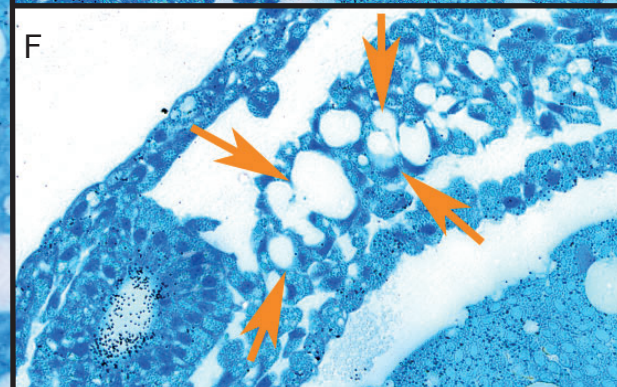
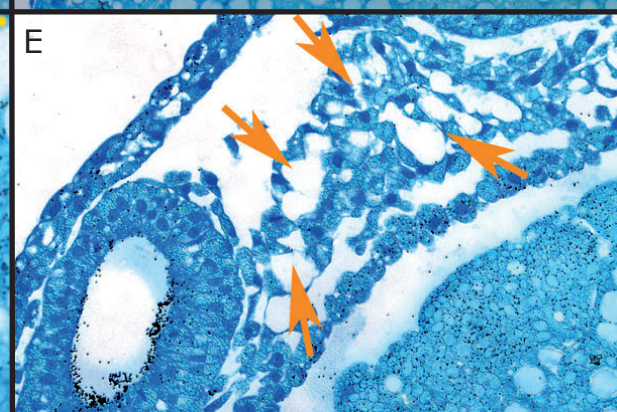
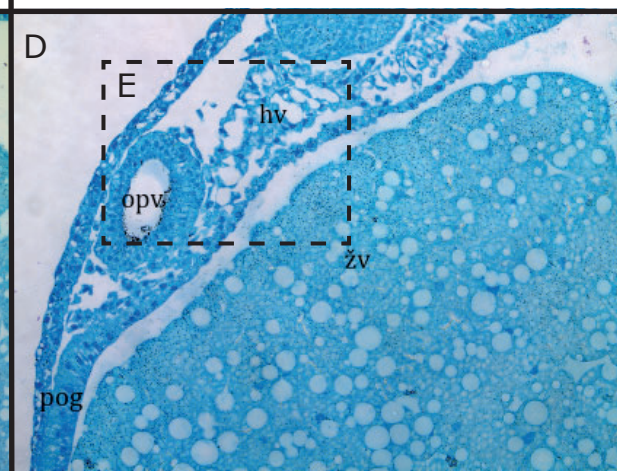
# Pozdní fáze

st. 25

## Mediální řez



## Laterální řez



**Tabule 9:** Pozdní fáze vývoje prechordální destičky u jesetera, st. 25

**A-D** - frontální řezy, nakrájel Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - řez nejpřednější částí hlavy

**B** - detail snímku A, černé tečky ukazují hranici předústního střeva a ektodermu

**C** - řez populací buněk prechordální destičky (oranžové tečky) před strunou hřbetní, oranžové šipky označují rozšiřování těchto mezenchymálních buněk do laterální oblasti hlavy

**D** - řez strunou hřbetní v její anteriorní části

**E-H** - horizontální řezy, hlava směřuje doleva

**E a G** - průřez hlavou v oblasti optických váčků

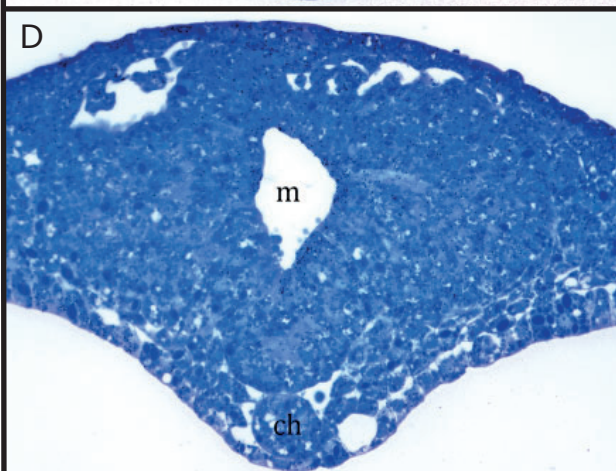
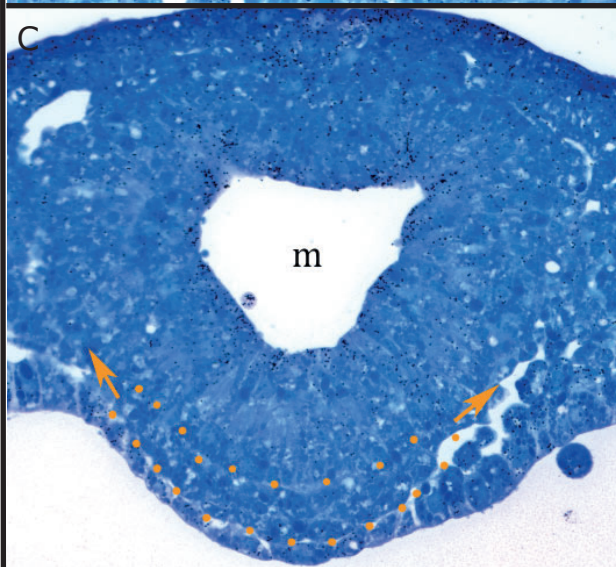
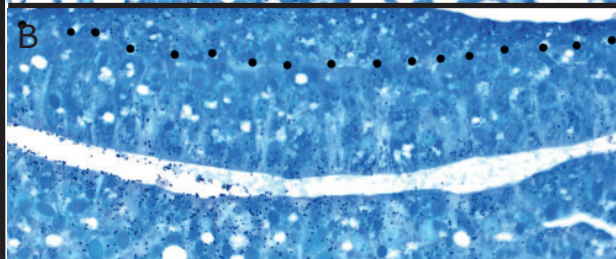
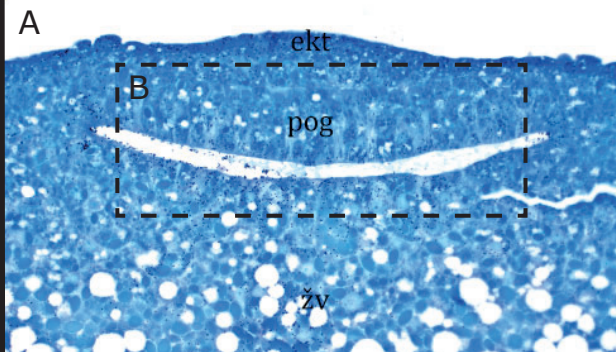
**F a H** - detail snímku E a G, oranžové šipky naznačují vytváření cyst v hlavovém mezenchymu v oblasti optického váčku



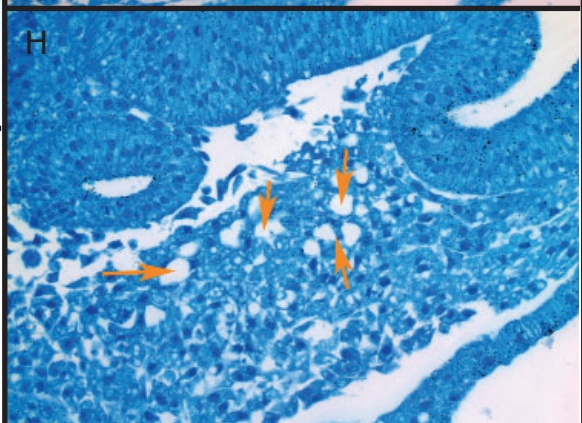
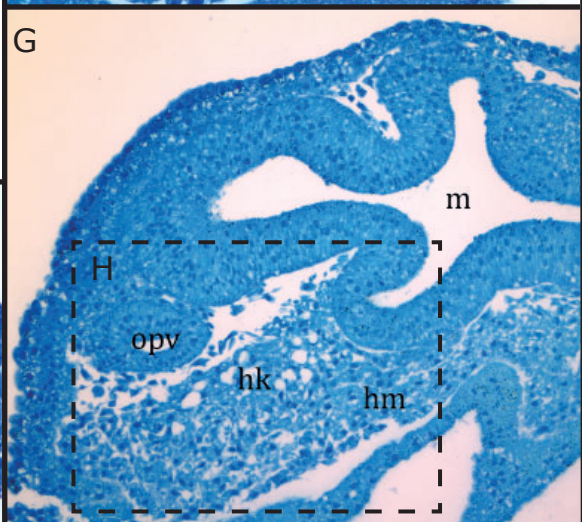
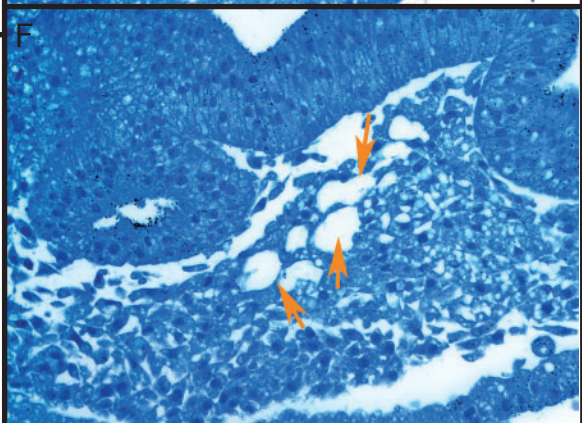
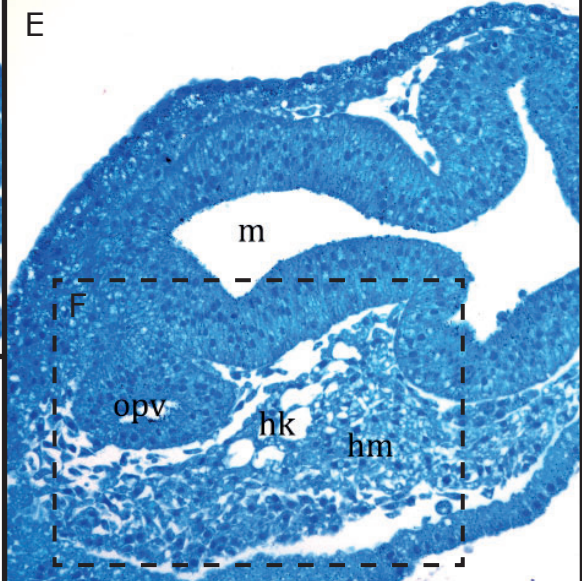
# Pozdní fáze

st. 25

## Frontální řez



## Horizontální řez





**Tabule 10:** Pozdní fáze vzniku prechordální destičky u jesetera, st. 26+

**A-C** - sagitální řezy mediální částí, hlava směřuje doleva

**A** - řez mediální částí hlavy

**B** - detail snímku A, žluté tečky ohraničují předústní střevo

**C** - detail snímku A, oranžové tečky ohraničují posteriorní populaci buněk prechordální destičky

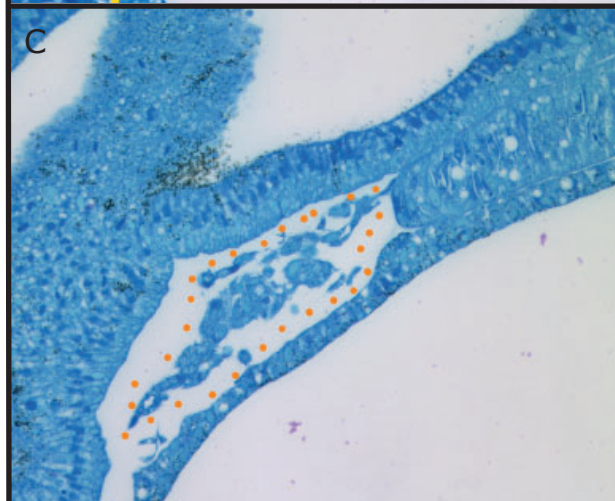
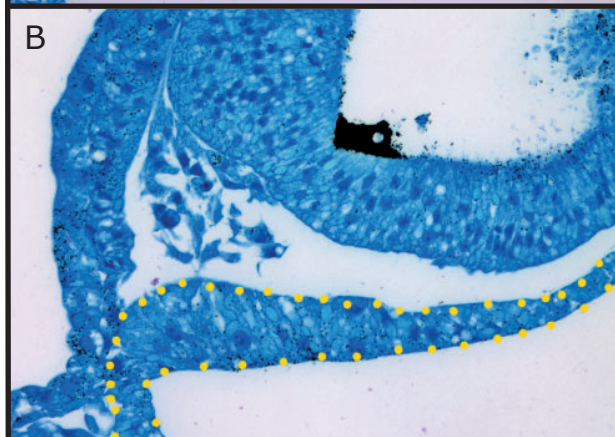
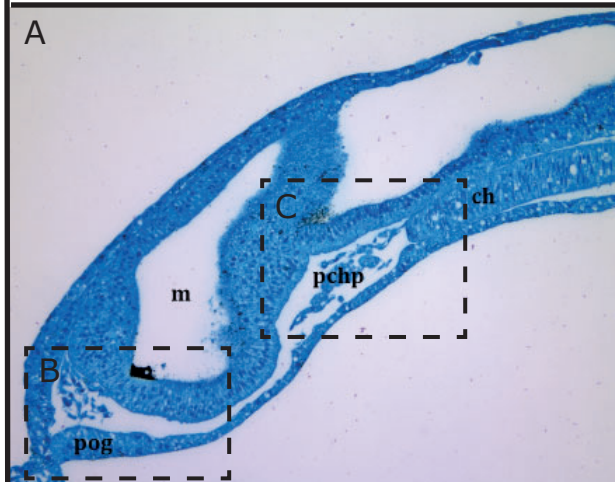
**D-J** - sagitální řezy laterální částí, hlava směřuje doleva

**D-J** - snímky ukazují průřez jedním párem hlavových kavit, označených oranžovou hvězdičkou

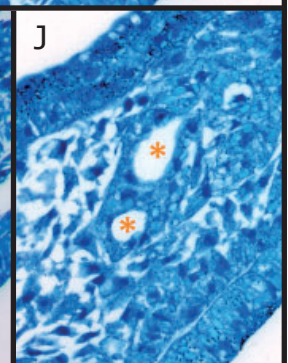
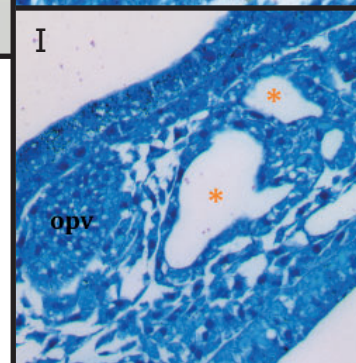
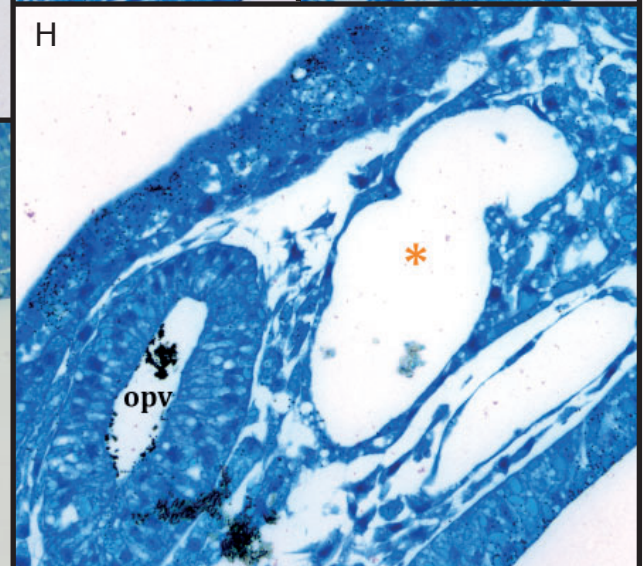
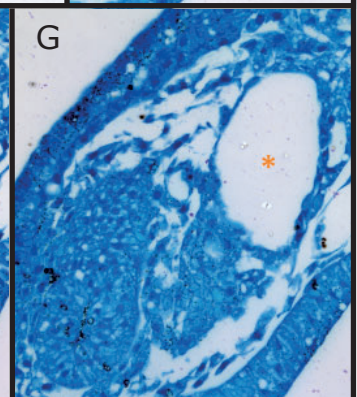
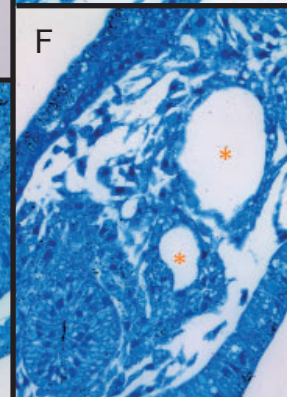
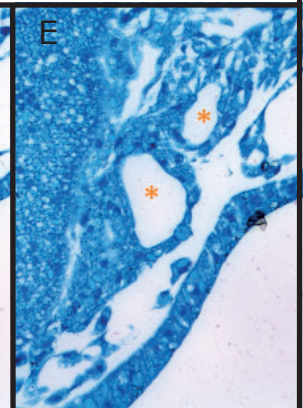
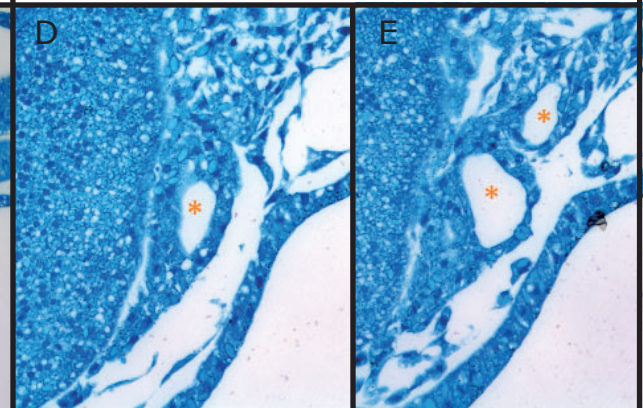
# Pozdní fáze

st. 26+

## Mediální řez



## Laterální řez



**Tabule 11:** Pozdní fáze vzniku prechordální destičky u jesetera, st. 26+

**A-D** - frontální řezy

**A** - průřez anteriorní částí hlavy

**B** - průřez částí hlavy za optickým váčkem

**C** - detail snímku B, oranžové hvězdičky označují levý pár hlavových kavit

**D** - průřez částí hlavy těsně před strunou hřbetní

**E-J** - horizontální řezy, hlava směřuje doleva

**E, G a I** - průřezy hlavou v její optické části

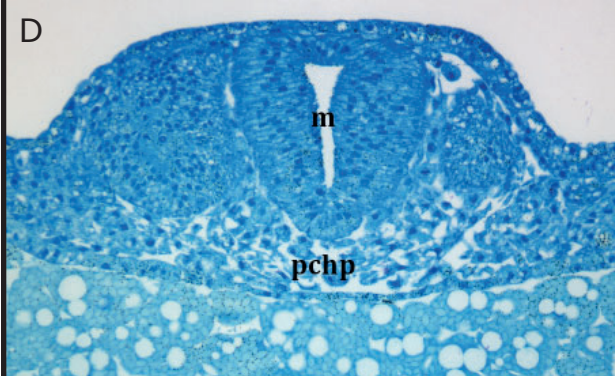
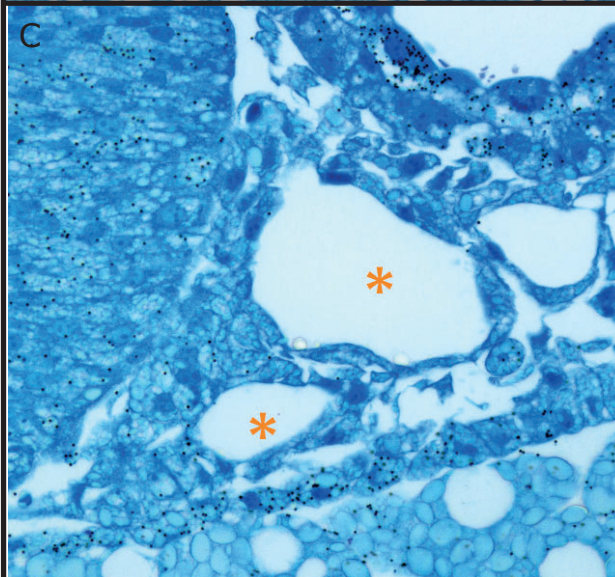
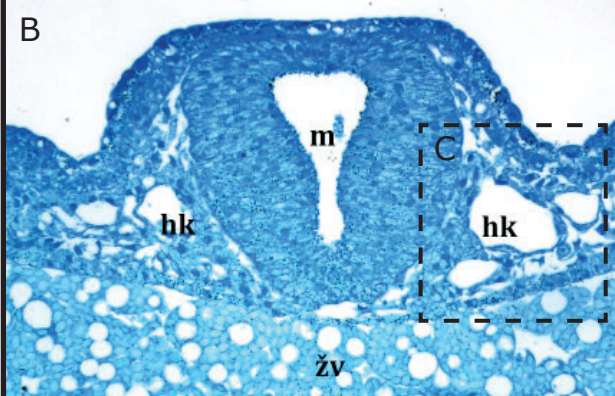
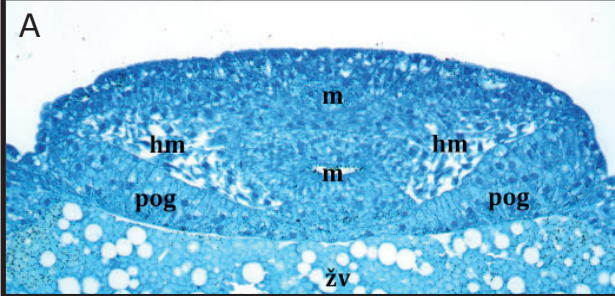
**F, H a J** - detaily předchozích snímků, oranžové hvězdičky značí pravý pár hlavových kavit



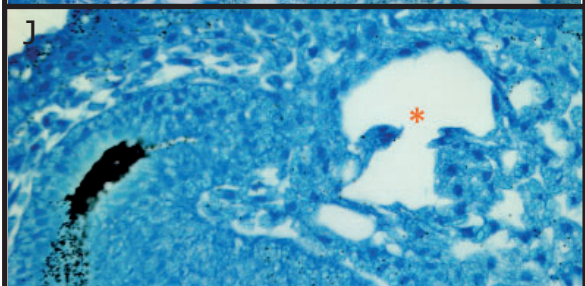
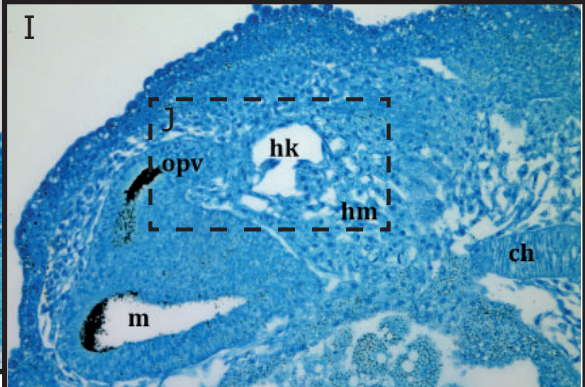
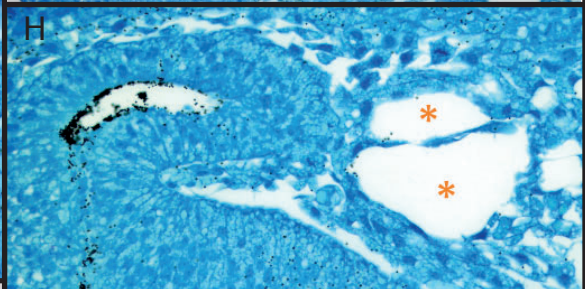
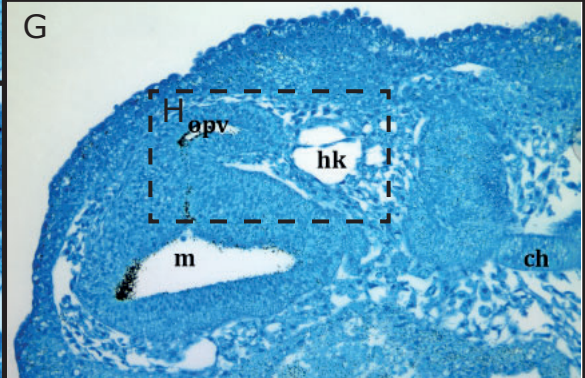
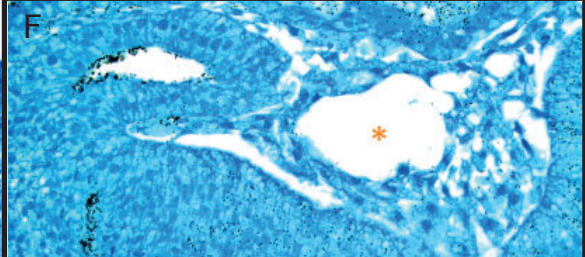
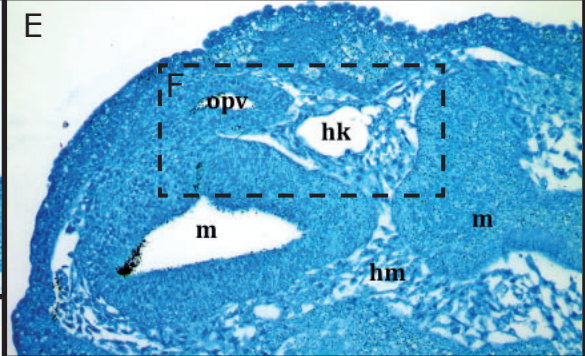
# Pozdní fáze

st. 26+

## Frontální řez



## Horizontální řez



**Tabule 12:** Raná fáze vývoje prechordální destičky u kostlína, st. 16

**A-C** - frontální řezy

**A** - řez anteriorní částí hlavy

**B** - oranžové hvězdičky ukazují rozvolněné buňky možné prechordální destičky v oblasti mezi předústním střevem a strunou hřbetní

**C** - řez strunou hřbetní těsně za její přední částí

**D-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

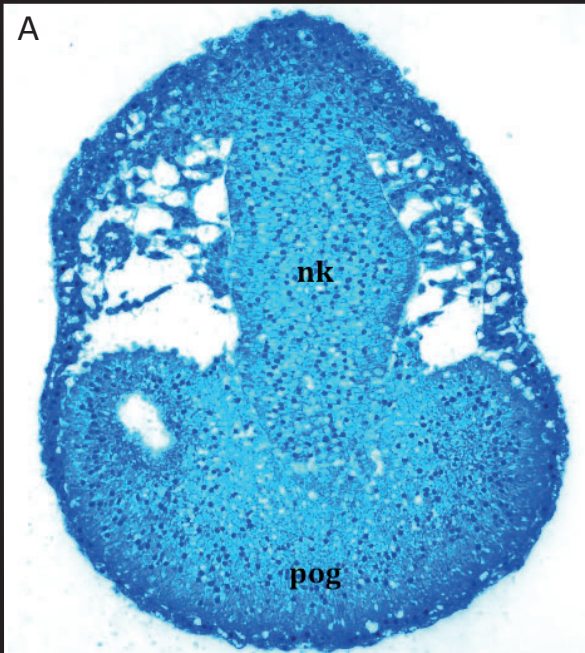
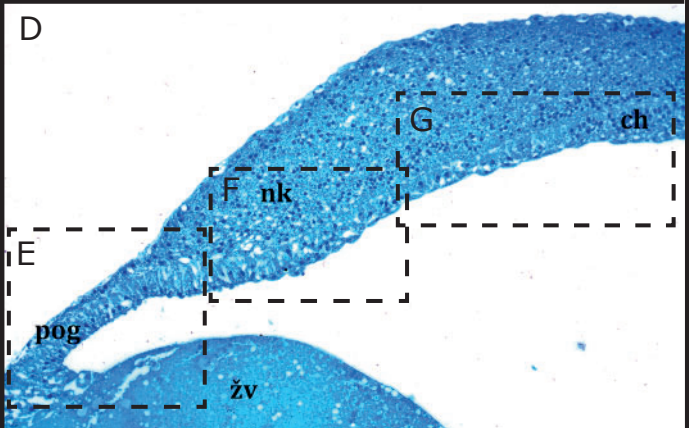
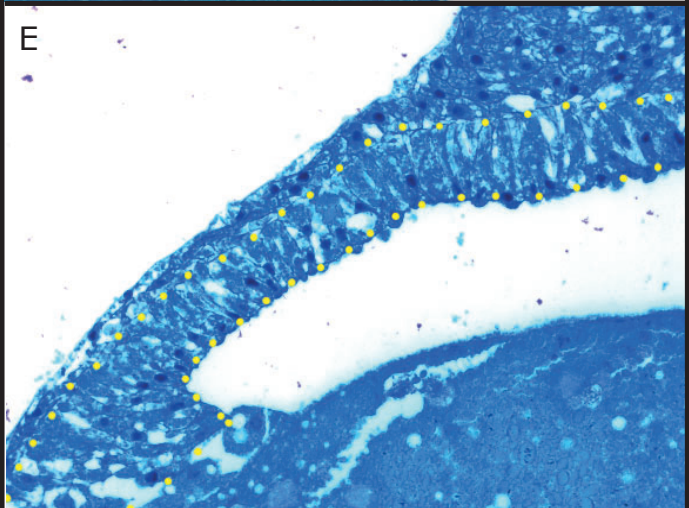
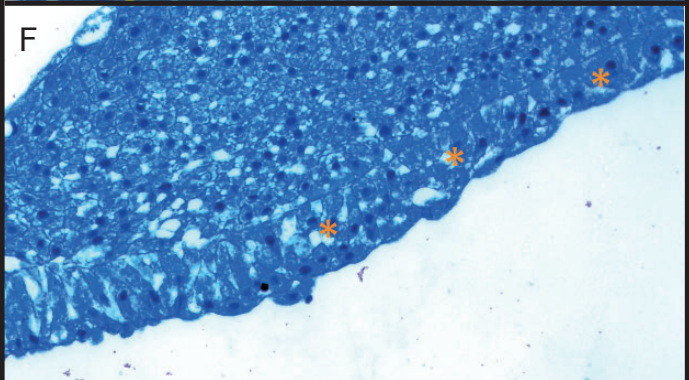
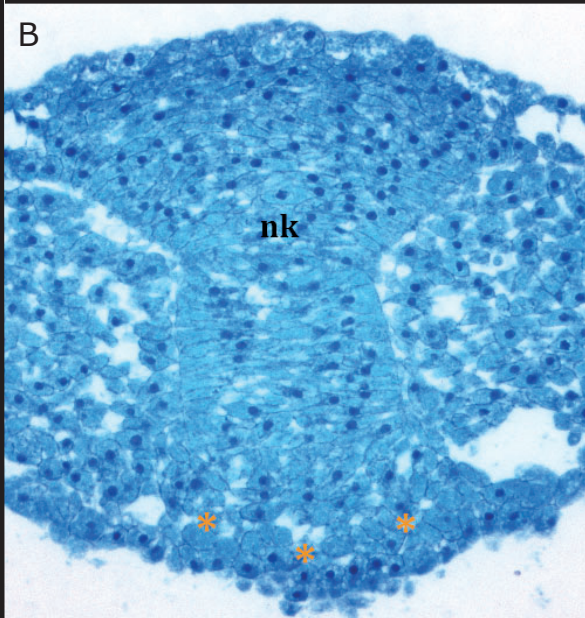
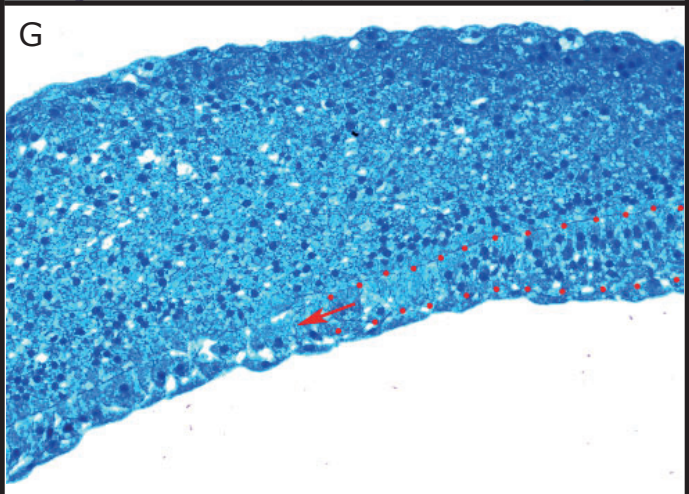
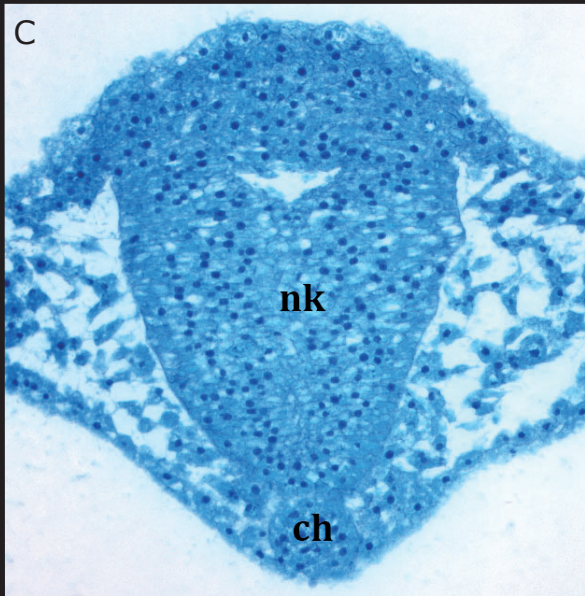
**D** - mediální řez oblastí hlavy

**E** - detail snímku D, žluté tečky ohraničují předústní střevo

**F** - detail snímku D, oranžové hvězdičky ukazují mezenchymální buňky, které se uvolňují ze struny hřbetní

**G** - detail snímku D, červené tečky ohraničují strunu hřbetní a červená šipka ukazuje směr uvolňování mezenchymálních buněk možné prechordální destičky ze struny hřbetní



Raná fáze	
st. 16	
Frontální řez	Mediální řez
<p>A</p>  <p>nk</p> <p>pog</p>	<p>D</p>  <p>G</p> <p>ch</p> <p>F nk</p> <p>E</p> <p>pog</p> <p>žv</p>
	<p>E</p> 
	<p>F</p> 
<p>B</p>  <p>nk</p>	<p>G</p> 
<p>C</p>  <p>nk</p> <p>ch</p>	



**Tabule 13:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u kostlína, st. 17

**A-D** - frontální řezy, nakrájela a vyfotila Mgr. Tereza Matějková

**A** - řez anteriorní částí hlavy, oranžové ??? označují mezenchymální buňky nad posteriorní částí předústního střeva

**B** - řez v oblasti mezi předústním střevem a strunou hřbetní, oranžové šipky ukazují směr rozšiřování do laterální části hlavy

**C** - detail snímku B, oranžová hvězdička označuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky

**D** - řez přední částí struny hřbetní

**E-H** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - mediální řez oblastí hlavy

**F** - detail snímku E, žluté tečky ohraničují epiteliální předústní střevo, žluté ??? označují posteriorní část, která se zdá být trochu rozvolněnější

**G** - detail snímku E, oranžové hvězdičky poukazují na populaci mezenchymálních buněk mezi předústním střevem a strunou hřbetní

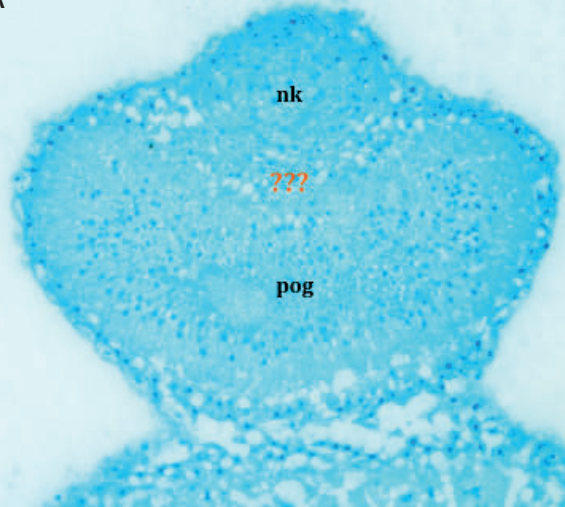
**H** - detail snímku E, červené tečky ohraničují strunu hřbetní a červená šipka naznačuje směr uvolňování posteriorních mezenchymálních buněk prechordální destičky ze struny hřbetní

# Střední fáze

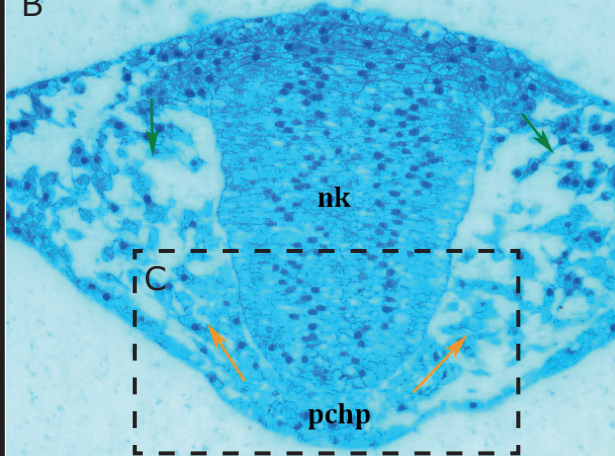
st. 17

## Frontální řez

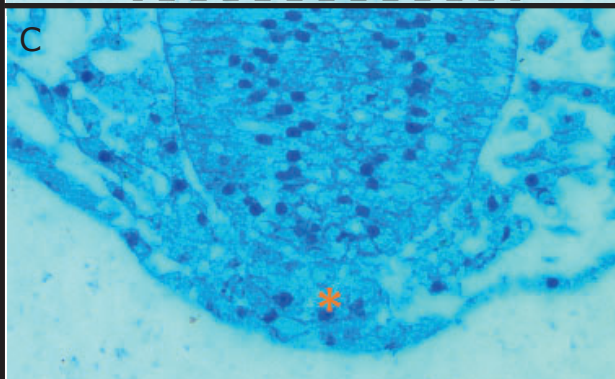
A



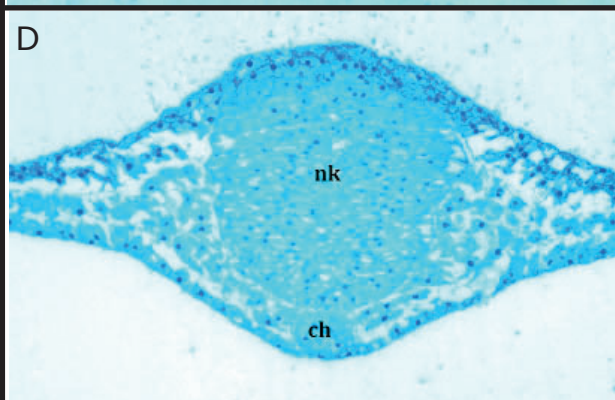
B



C

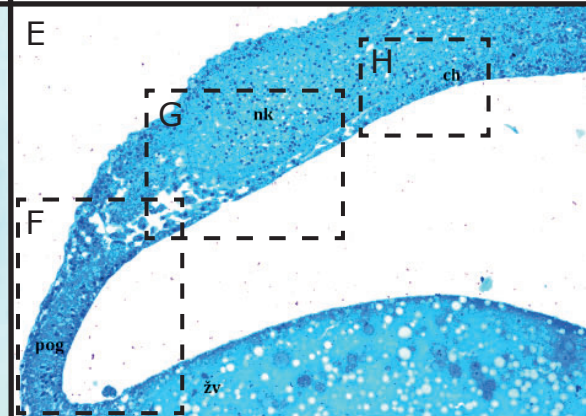


D

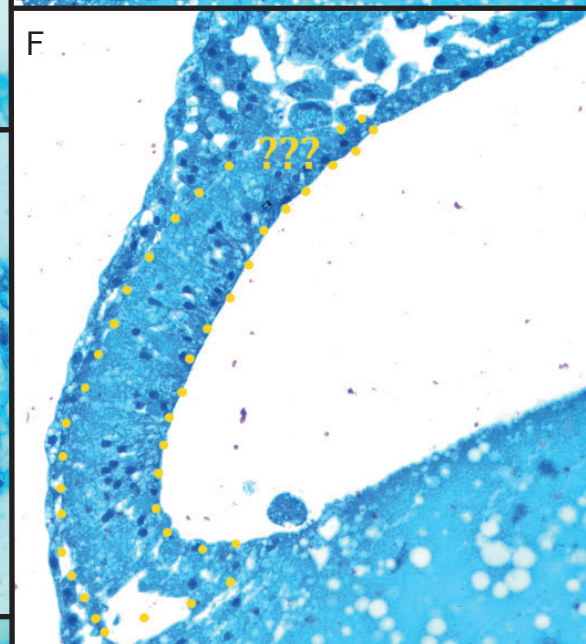


## Mediální řez

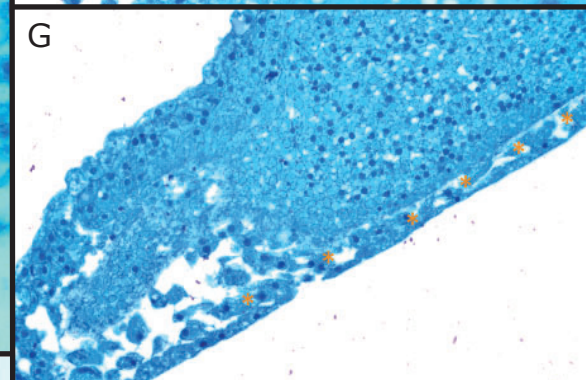
E



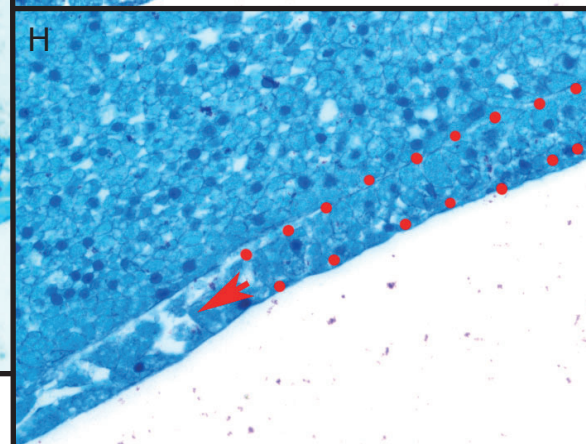
F



G



H



**Tabule 14:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u kostlína, st. 18

**A-D** - frontální řezy

**A** - řez anteriorní částí hlavy

**B** - řez oblastí mezi předústním střevem a strunou hřbetní

**C** - detail snímku B, oranžové šipky naznačují rozšiřování mezenchymálních buněk z mediální oblasti posteriorní prechordální destičky

**D** - řez strunou hřbetní v oblasti prvního somitu

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - mediální průřez oblastí hlavy

**F** - detail snímku E, žluté hvězdičky označují předústní střevo, které se přeměňuje na cementový orgán

**G** - detail snímku E, červené tečky ohraničují uzavřenou strunu hřbetní a oranžové tečky ohraničují posteriorní populaci buněk prechordální destičky

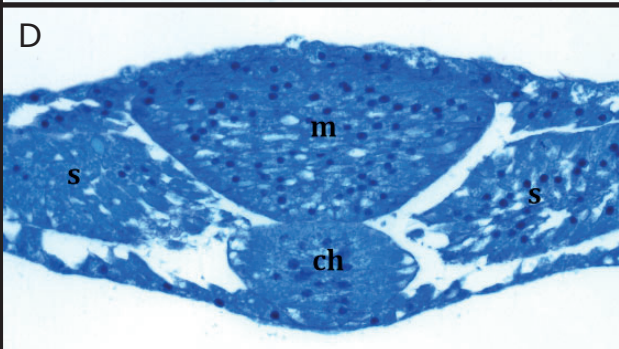
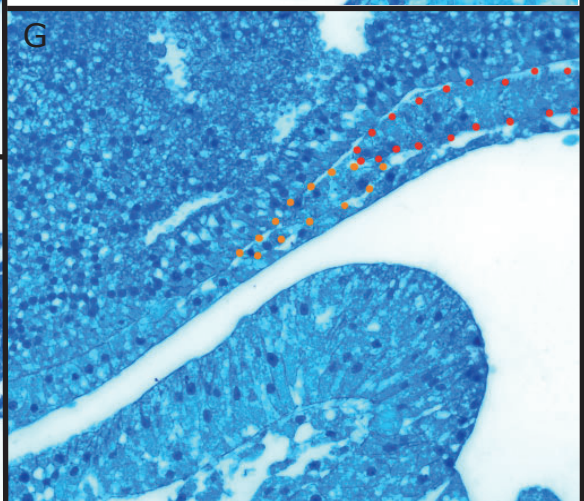
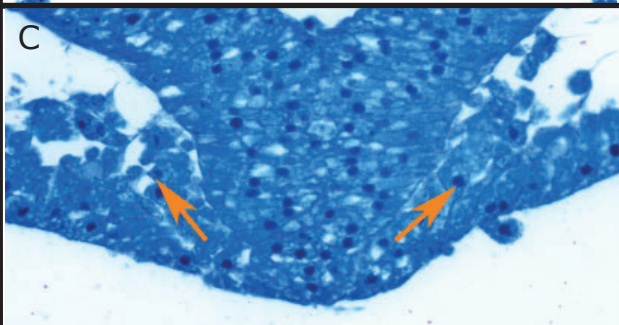
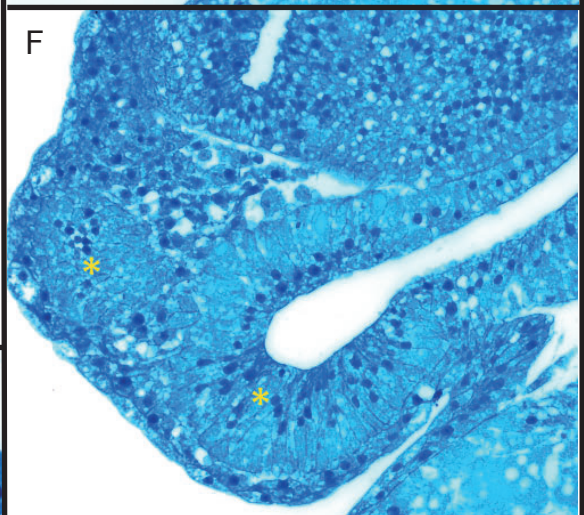
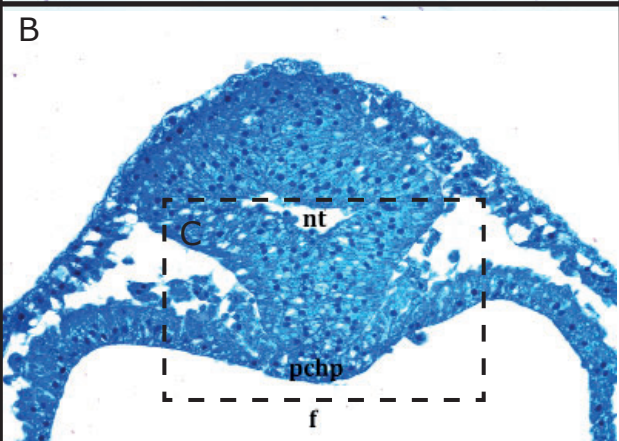
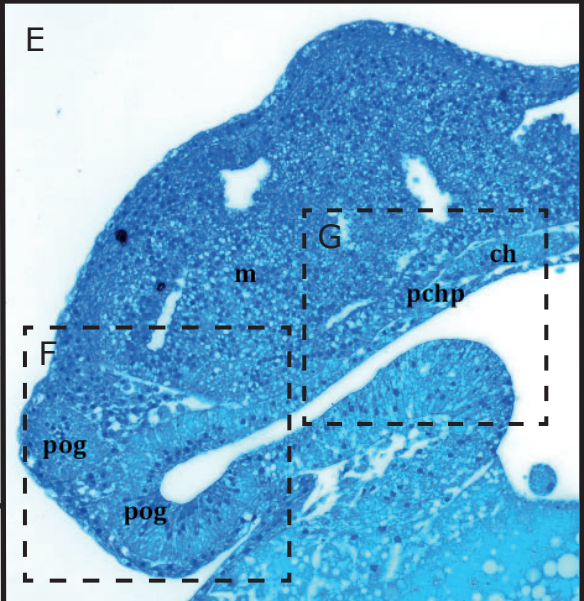
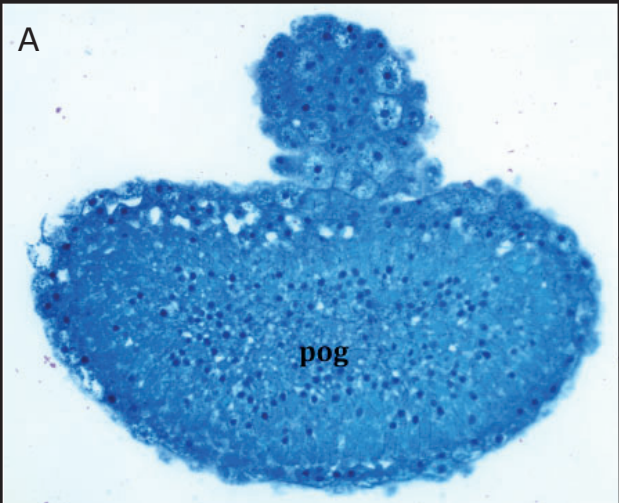


## Střední fáze

st. 18

### Frontální řez

## Mediální řez



**Tabule 15:** Střední fáze u kostlína, protilátky **Fibronectin** a **DAPI**, st. 18

**A-B, D-E** - imunohistochemický sagitální řez

**A** - mediální řez oblastí hlavy, bílá šipka ukazuje do oblasti anteriorní části struny hřbetní, červená protilátka fibronectin zde není, neboť ze struny hřbetní se uvolňují buňky pro posteriorní prechordální destičku

**B** - detail snímku A na oblast v anteriorní části struny hřbetní

**D** - stejný snímek jako A, pouze s protilátkou DAPI

**E** - detail snímku D na oblast v anteriorní části struny hřbetní

**C a F** - histologický sagitální řez, pro lepší porozumění imunohistochemických řezů

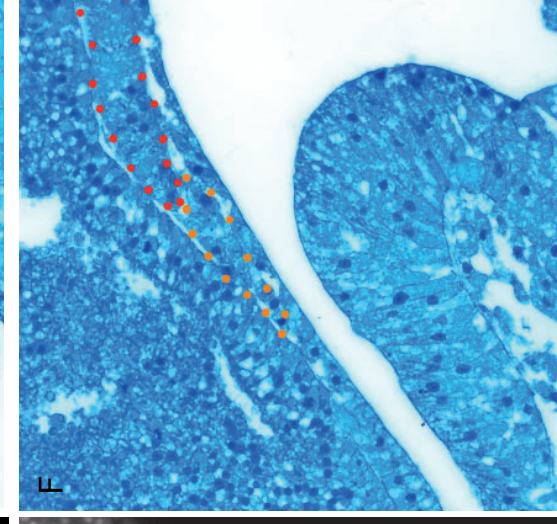
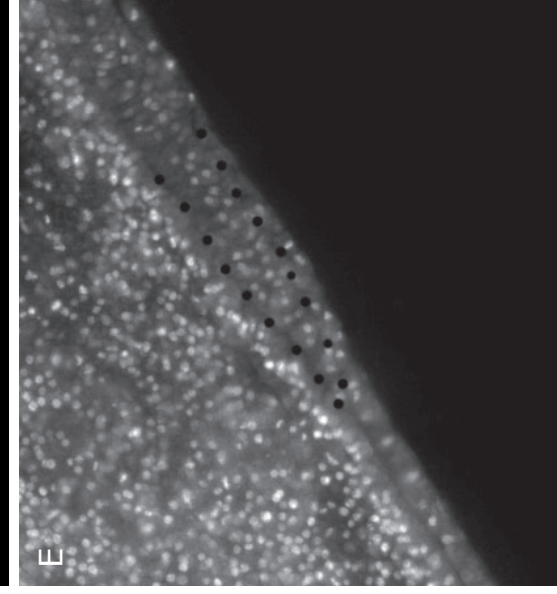
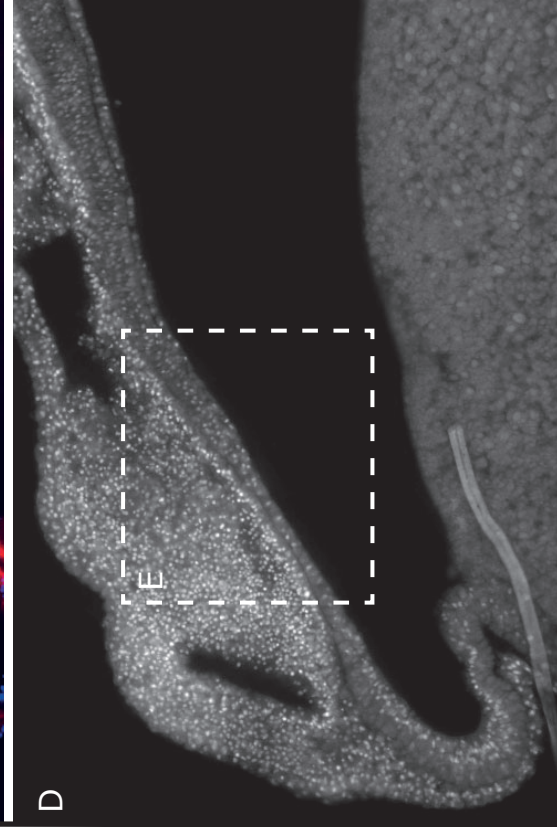
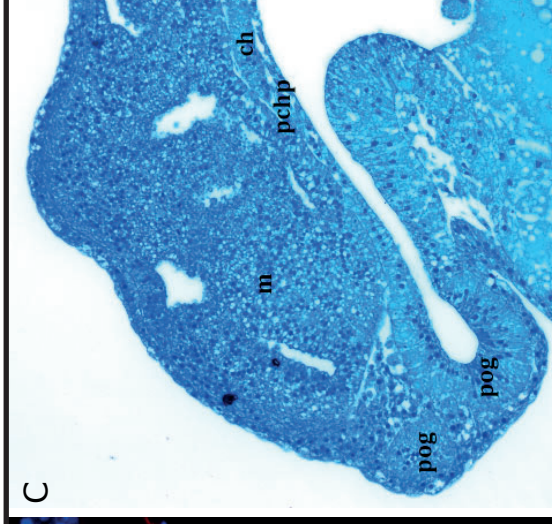
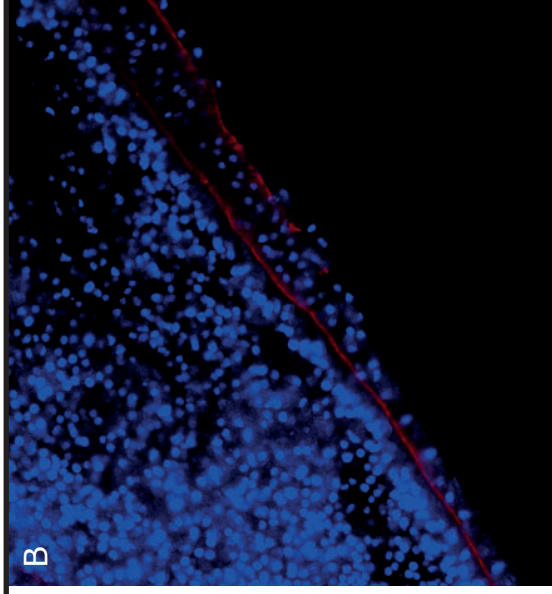
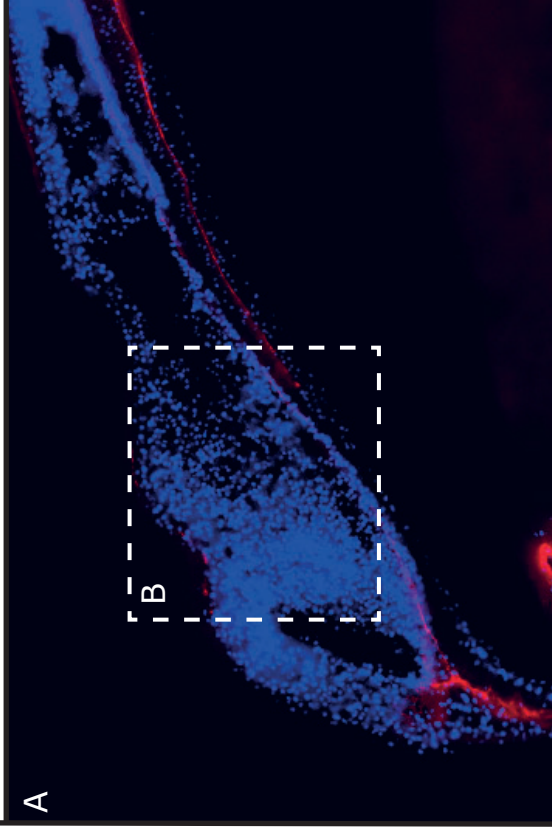
**C** - mediální řez oblastí hlavy

**F** - detail snímku C



Střední fáze

st. 18



**Tabule 16:** Střední fáze u kostlína, protilátky **Fibronectin** a **DAPI**, st. 18

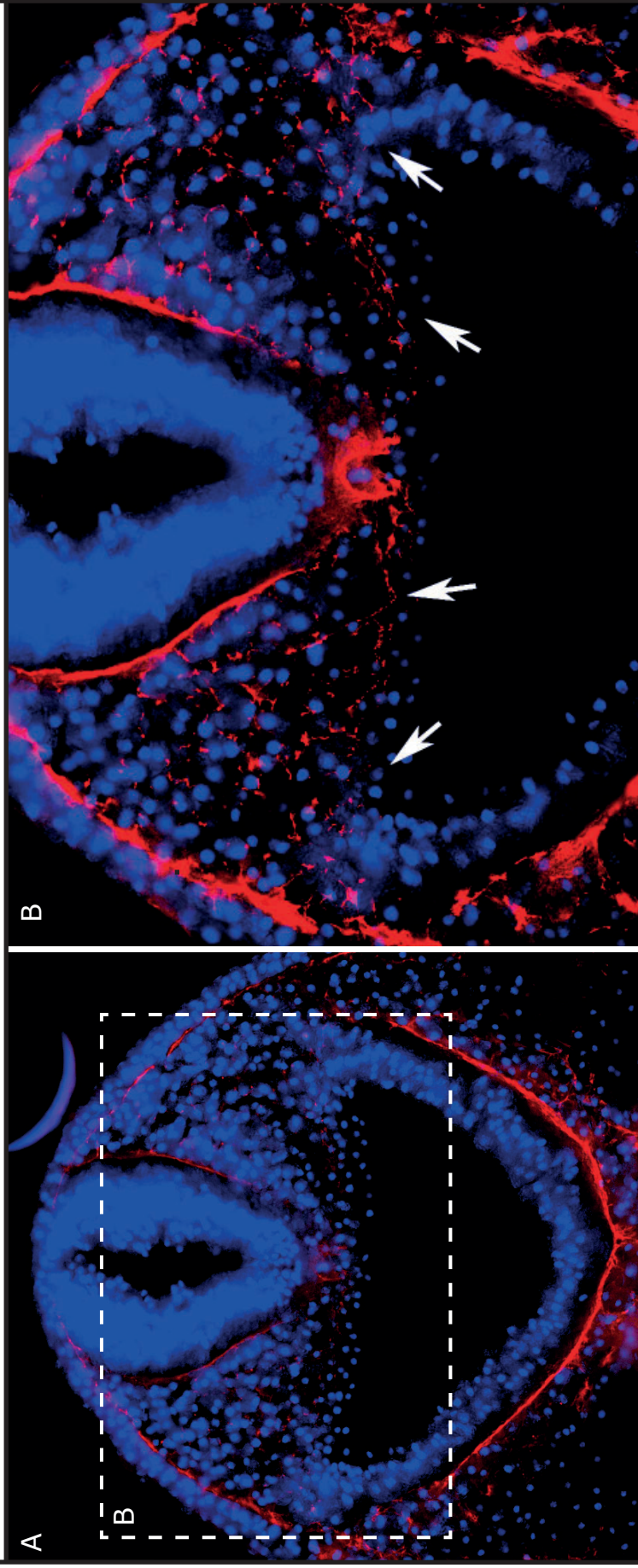
**A-B** - imunohistochemický frontální řez

**A** - řez oblastí nejanteriornější částí struny hřbetní, červená protilátka fibronectin zobrazuje kontinuální linii bazální laminy na epitelu prvostřeva a mozku

**B** - detail snímku A, bílé šipky ukazují na oblast svrchního endodermu prvostřeva, kde můžeme vidět mezenchymální buňky v okolí struny hřbetní

**Střední fáze**

**st. 18**





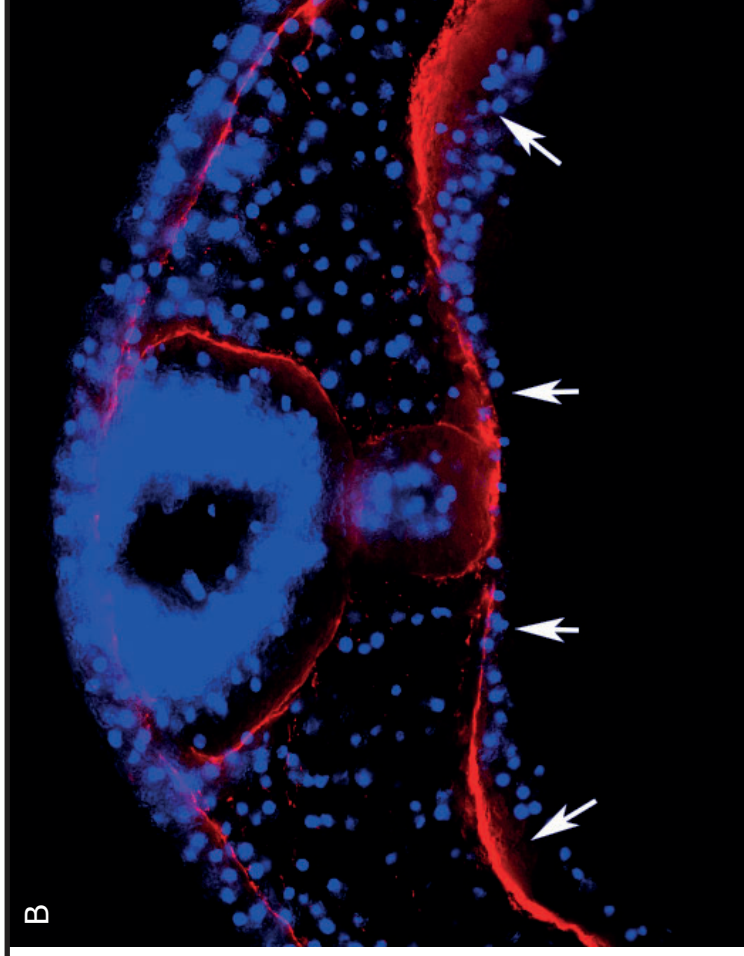
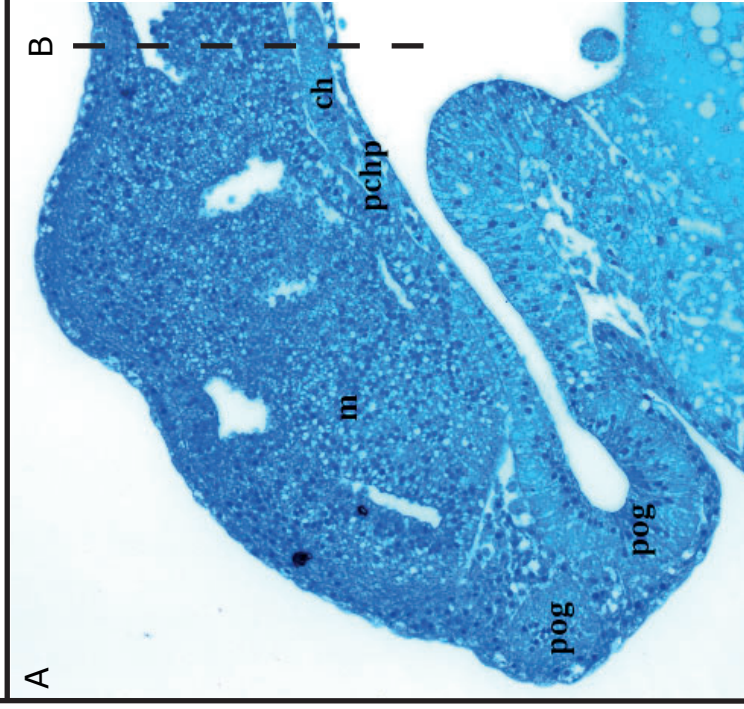
**Tabule 17:** Střední fáze u kostlína, protilátky **Fibronectin** a **DAPI**, st. 18

**A** - sagitální řez oblastí hlavy, přerušovaná čára označuje místo frontálního řezu B

**B** - imunohistochemický frontální řez oblastí struny hřbetní, červená protilátka fibronectin zobrazuje kontinuální linii bazální laminy na svrchní straně prvostřeva

**Střední fáze**

**st. 18**



**Tabule 18:** Střední fáze u kostlína, protilátky **Fibronectin** a **DAPI**, st. 18

**A-D** - imunohistochemický sagitální řezy

**A** - řez v laterální části hlavy, červená protilátka fibronectin zobrazuje kontinuální linii bazální laminy u předústního střeva a prvostřeva

**B** - stejný řez jako snímek A, pouze s protilátkou DAPI, pro lepší orientaci danými strukturami

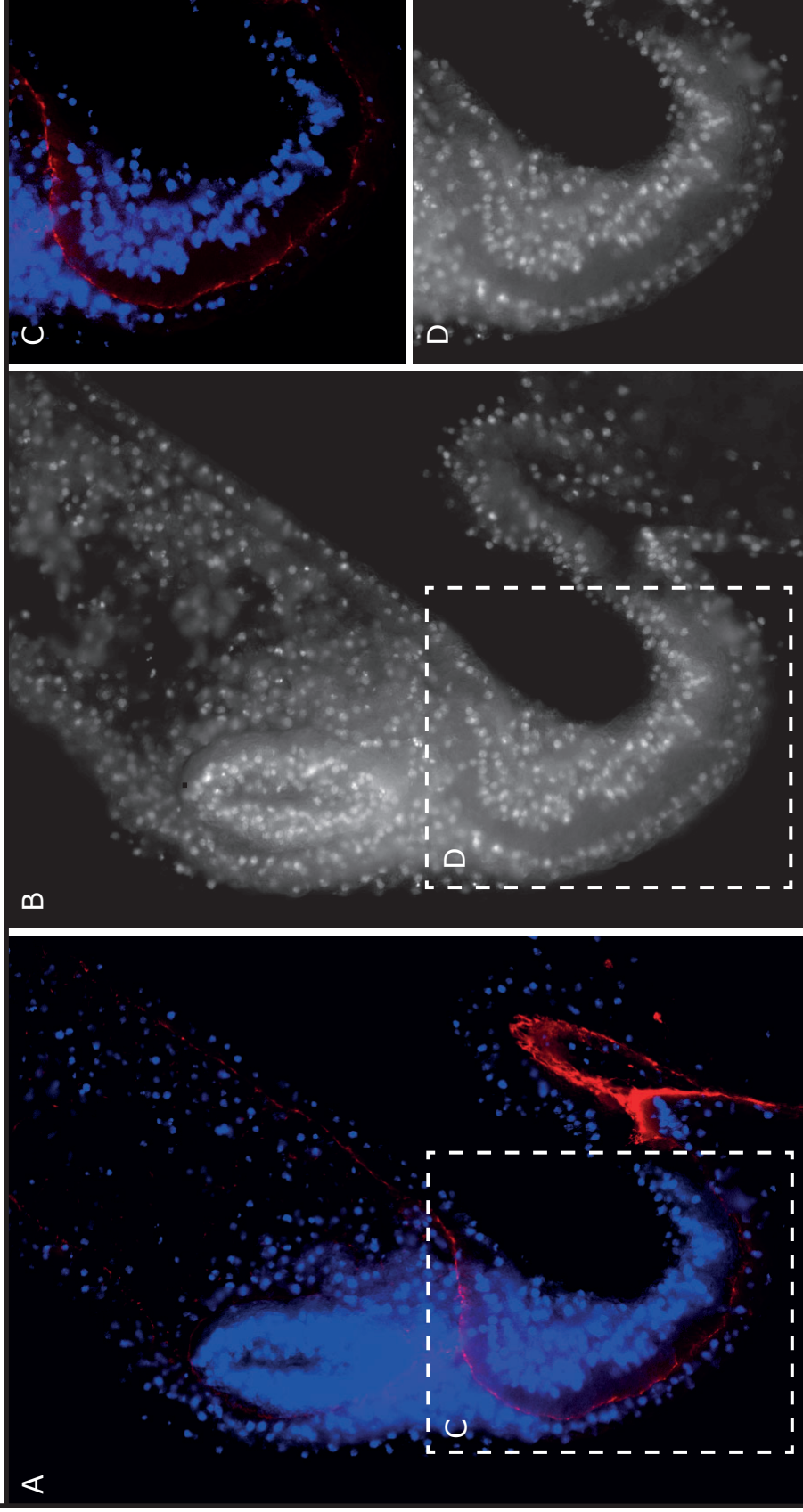
**C** - detail snímku A, bližší pohled na předústní střevo s protilátkou Fibronectin

**D** - detail obrázku B, znovu pouze protilátka DAPI, pro lepší orientaci



**Střední fáze**

**st. 18**



**Tabule 19:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u kostlína, st. 18+

**A-D** - frontální řezy

**A** - řez nejanteriornější částí hlavy, oranžové ??? označují mezenchymální buňky ležící nad předústním střevem

**B** - řez přední částí hlavy v oblasti optických váčků

**C** - detail snímku B, žluté tečky tvoří svrchní hranici prvostřeva, oranžové ohraničují mediální populaci buněk prechordální destičky, oranžové šipky naznačují směr rozšiřování posteriorních buněk prechordální destičky do laterální části hlavy

**D** - anteriorní část struny hřbetní

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - mediální řez oblastí hlavy, oranžové ??? označují mezenchymální buňky, které se nedají rozlišit odkud vznikly

**F** - detail snímku E, červené tečky ohraničují strunu hřbetní, černé spodní stranu mozku a žluté svrchní stranu prvostřeva, oranžová hvězdička označuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky

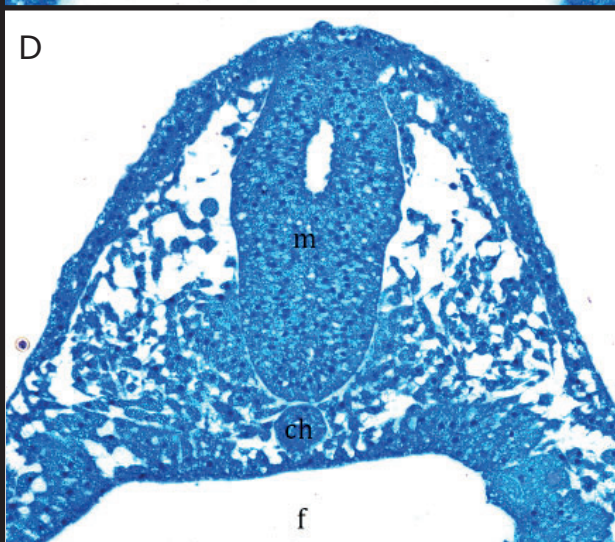
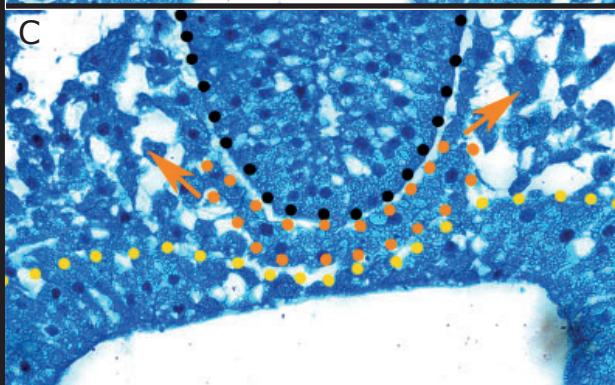
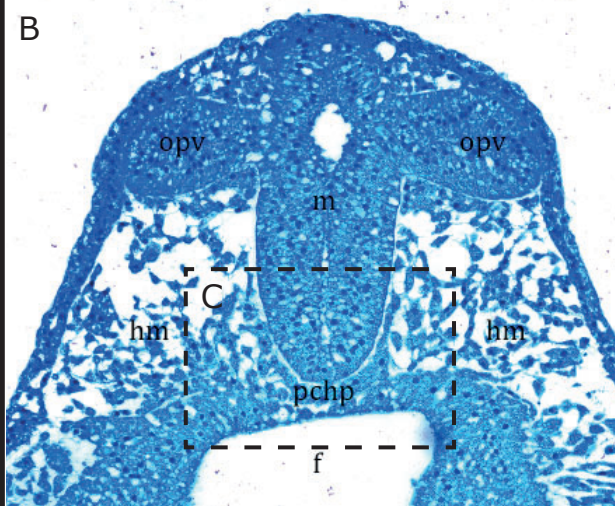
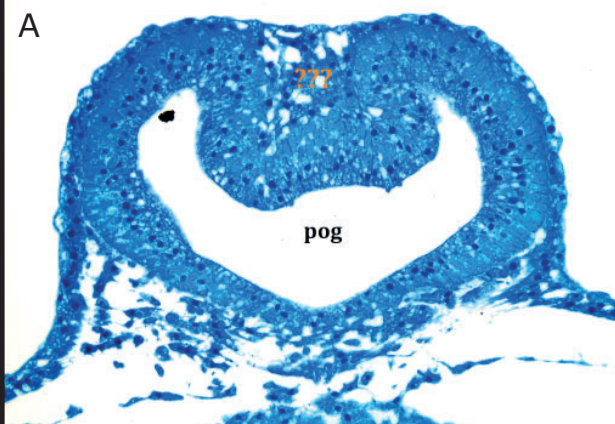
**G** - detail snímku E, žluté hvězdičky označují možné uvolňování mezenchymálních buněk z endodermu prvostřeva



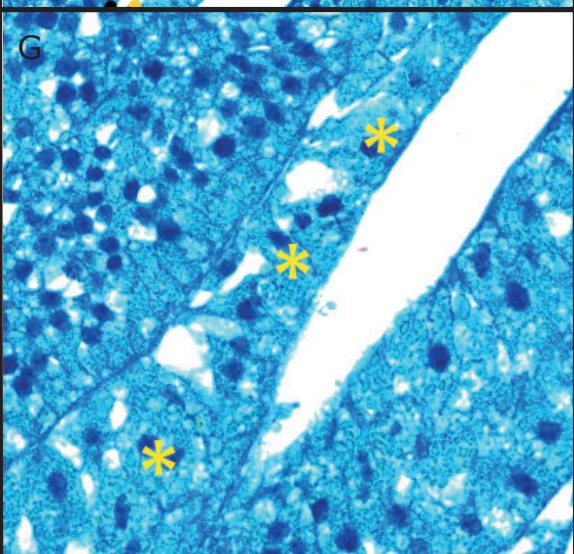
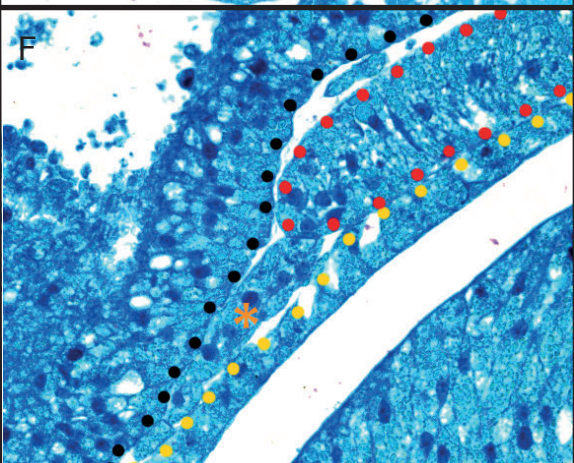
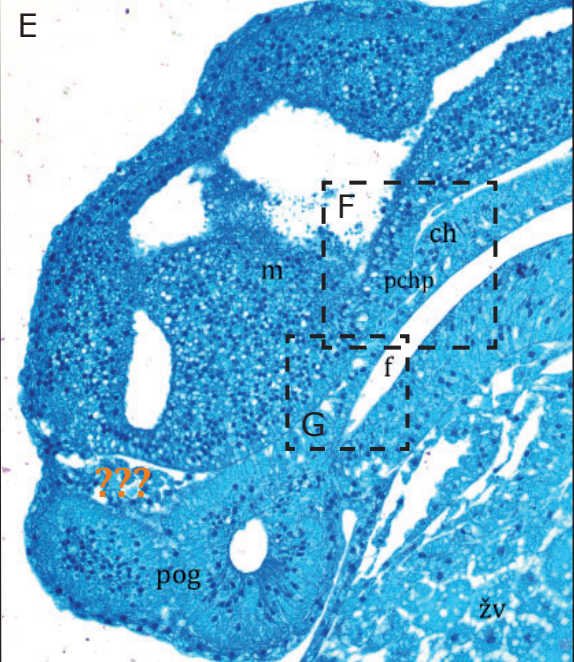
# Střední fáze

st. 18+

## Frontální řez



## Mediální řez





**Tabule 20:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u kostlína, st. 19

**A-D** - frontální řezy

**A** - řez těsně před strunou hřbetní

**B** - detail snímku A, oranžová hvězdička znázorňuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky, oranžové šipky ukazují směr rozšíření těchto buněk do laterální části hlavy

**C** - nejanteriornější část struny hřbetní

**D** - řez strunou hřbetní v její anteriorní části

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - mediální řez v oblasti hlavy

**F** - detail snímku E, žluté hvězdičky znázorňují předústní střevo, ze kterého vznikají cementové orgány

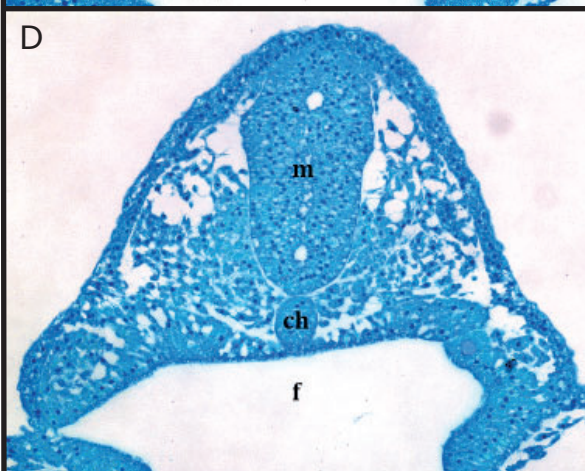
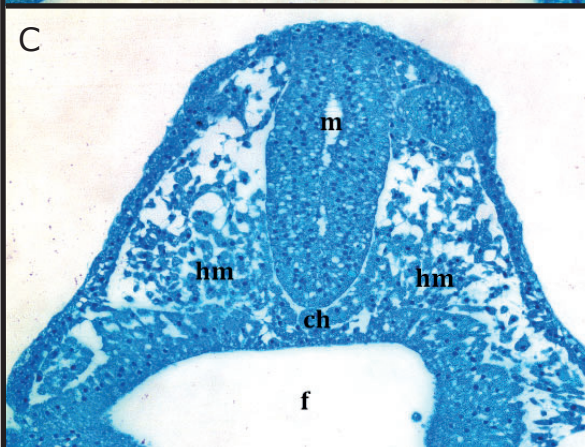
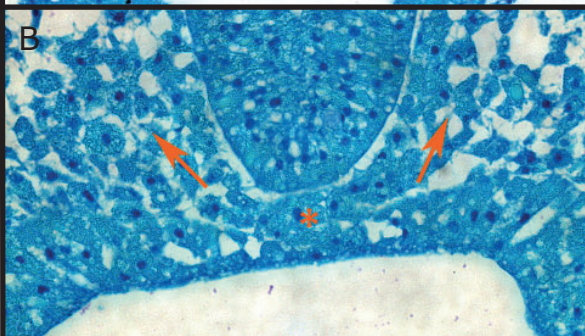
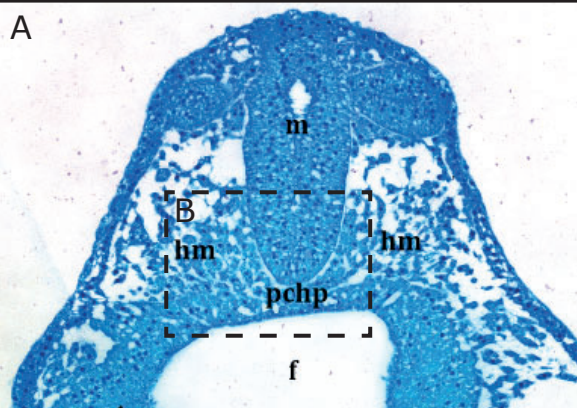
**G** - detail snímku E, oranžová hvězdička označuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky



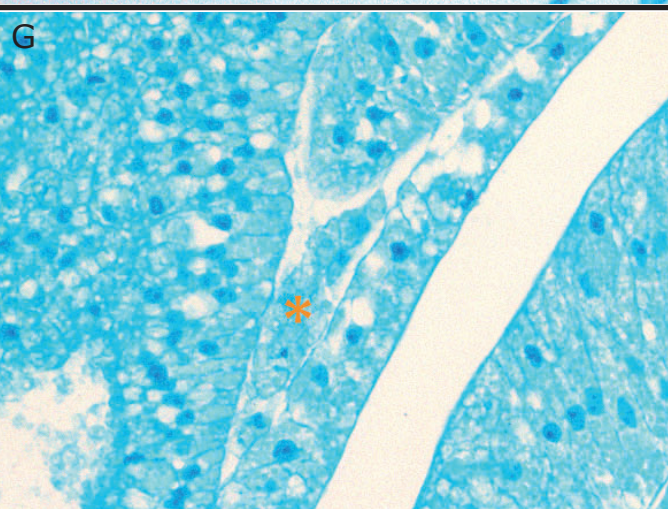
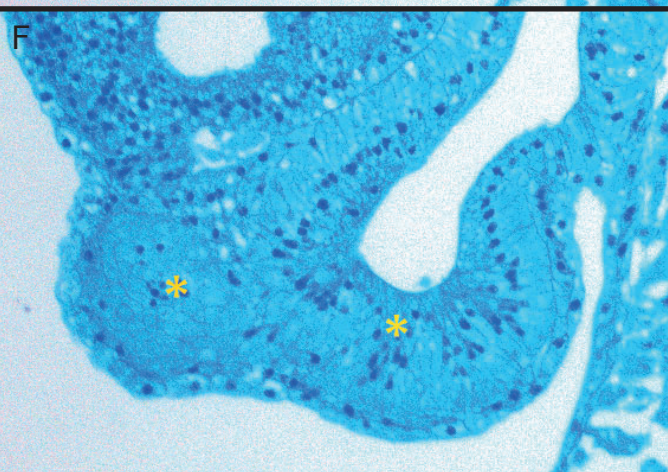
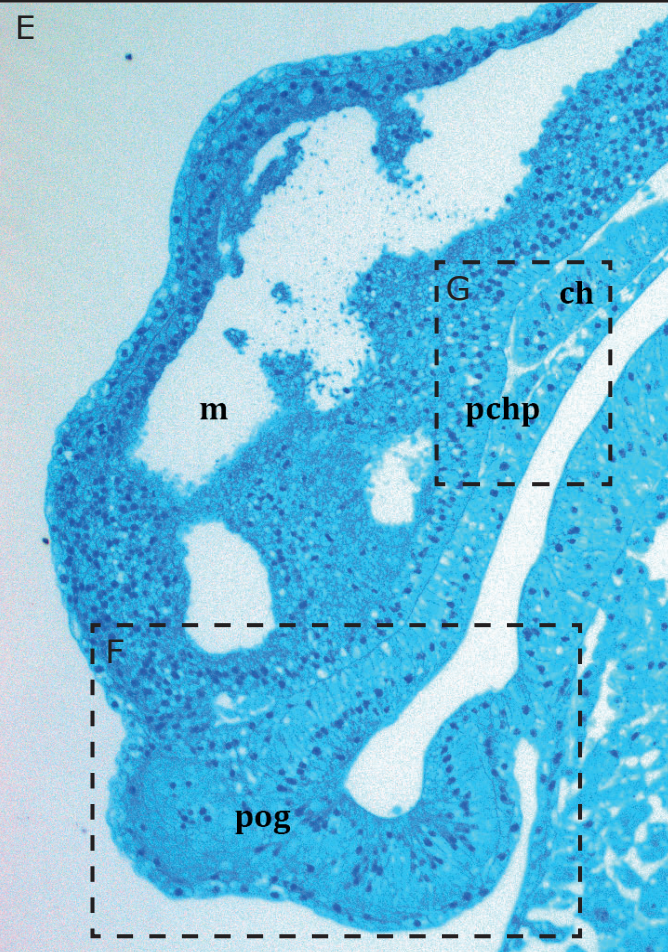
# Střední fáze

st. 19

## Frontální řez



## Mediální řez



**Tabule 21:** Střední fáze u kostlína, protilátky **Fibronectin** a **DAPI**, st. 19

**A-D** - imunohistochemický sagitální řez

**A** - mediální řez oblastí hlavy, bílá šipka ukazuje na posteriorní populaci buněk prechordální destičky

**B** - stejný snímek jako A, pro lepší viditelnost jednotlivých struktur v oblasti hlavy zobrazeno pomocí protilátky DAPI

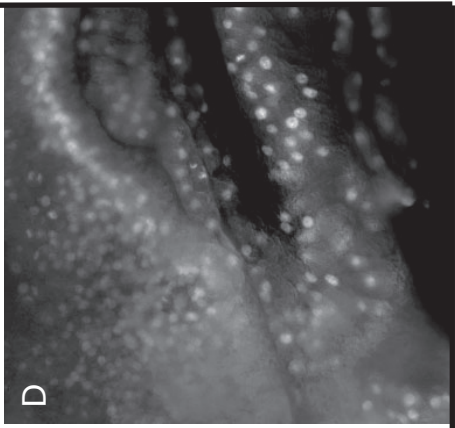
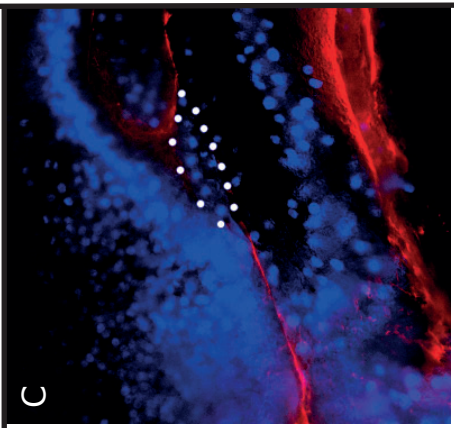
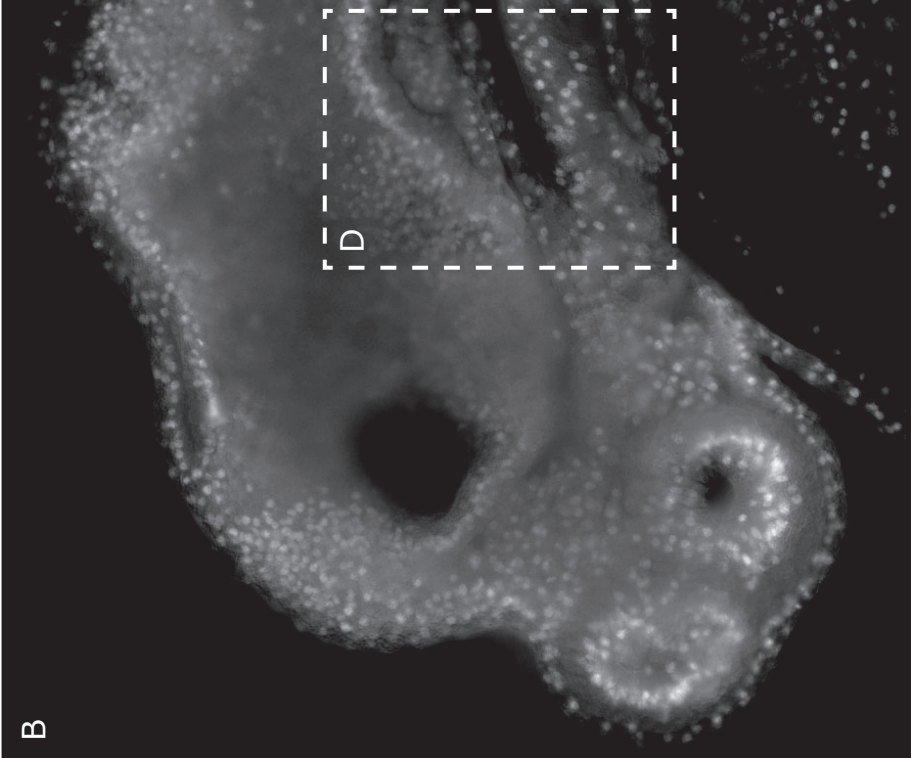
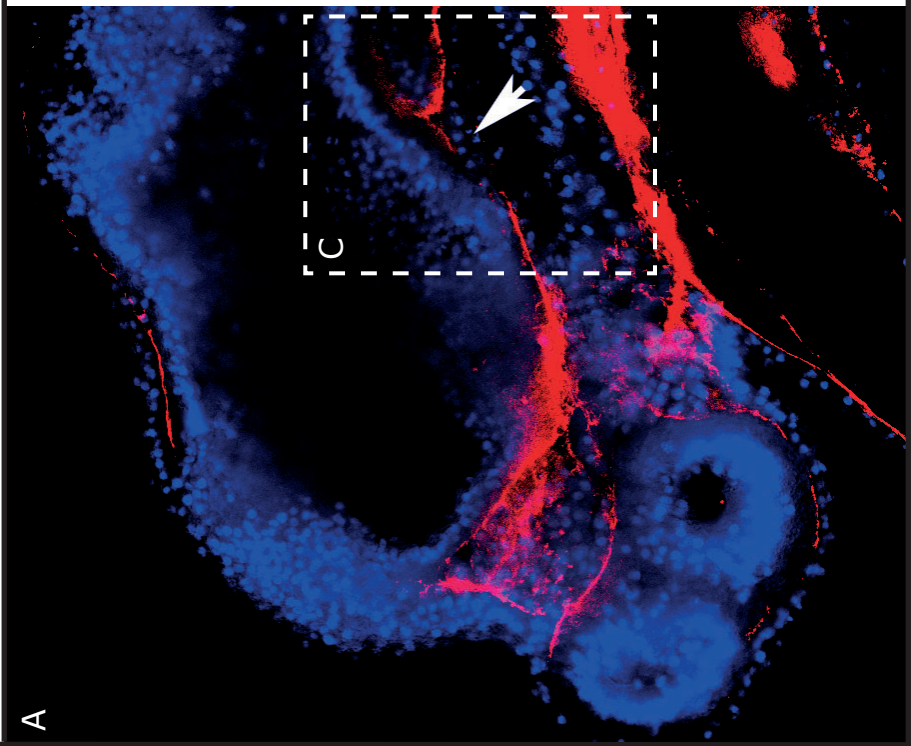
**C** - detail snímku A, červená protilátka fibronectin je kontinuální okolo anteriorní části struny hřbetní, v posteriorní populaci buněk prechordální destičky není vidět skoro vůbec

**D** - detail snímku B



Střední fáze

st. 19



**Tabule 22:** Pozdní fáze vývoje prechordální destičky u kostlína, st. 20

**A-C** - frontální řezy

**A** - řez anteriorní částí hlavy, z předústního střeva se vytvořily cementové orgány

**B** - řez oblastí těsně před strunou hřbetní

**C** - detail snímku B, oranžové šipky znázorňují rozšiřování mezenchymálních buněk prechordální destičky z mediální oblasti, zelené šipky migraci buněk neurální lišty

**D-F** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**D** - řez mediální částí hlavy

**E** - detail snímku D, žluté hvězdičky označují jednotlivé cementové orgány

**F** - detail snímku D, černé tečky označují těsnou hranici mezi mozkem a prvostřevem

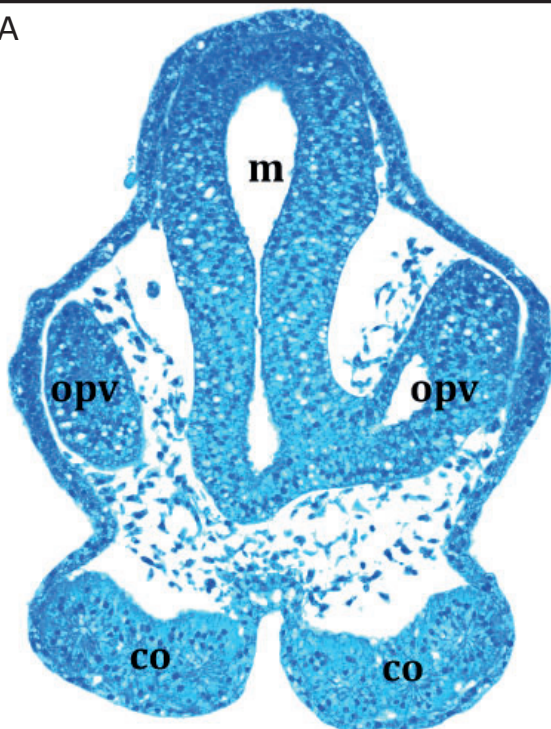


# Pozdní fáze

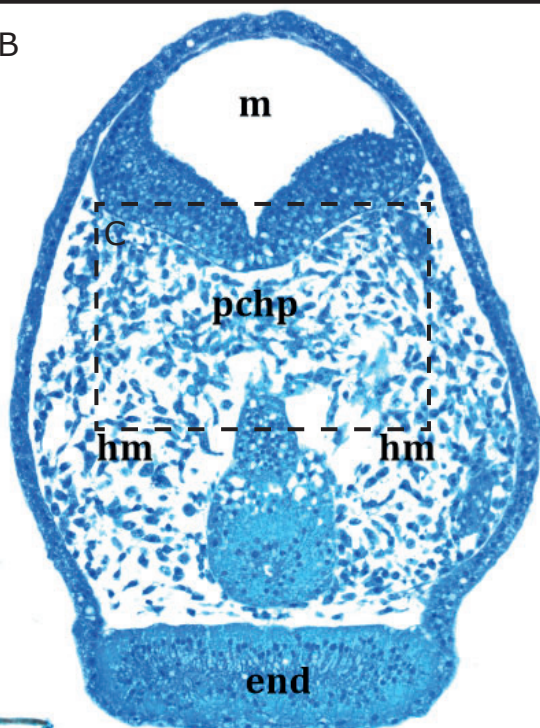
st. 20

## Frontální řez

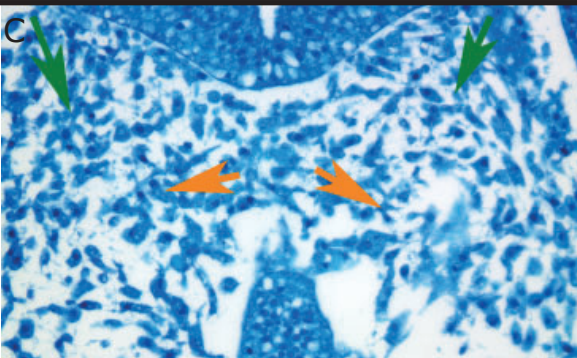
A



B

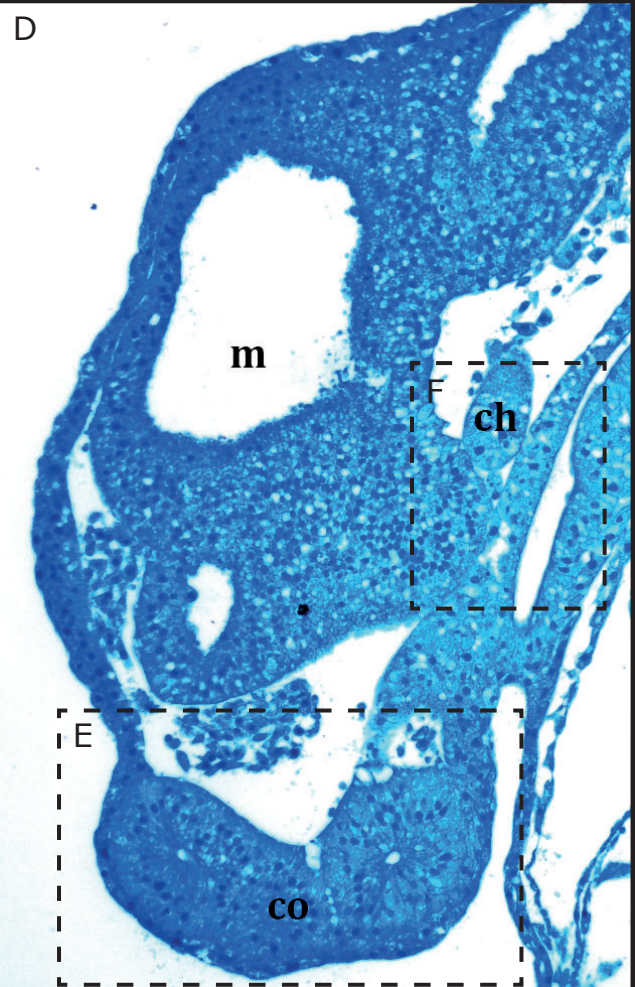


C

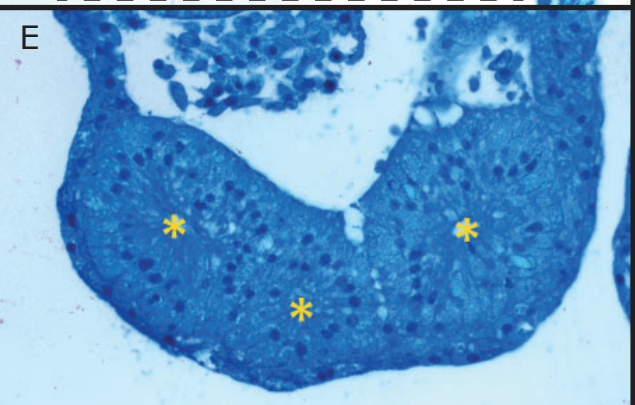


## Mediální řez

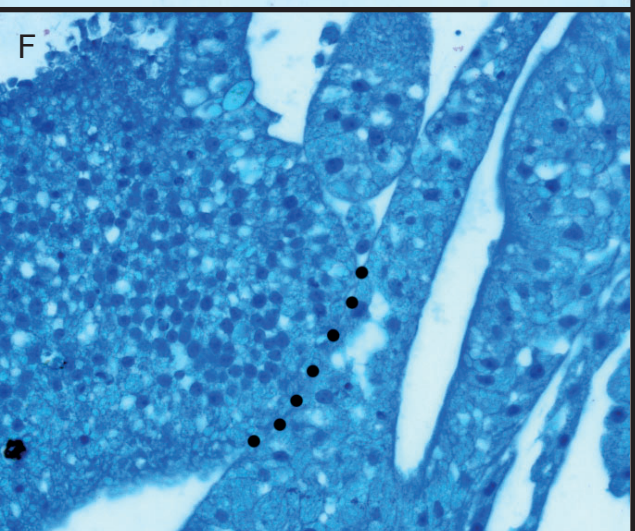
D



E



F





**Tabule 23:** Pozdní fáze vývoje prechordální destičky u kostlína, st. 21

**A-D** - frontální řezy

**A** - řez v oblasti optického váčku

**B** - detail snímku A, oranžová hvězdička naznačuje vytvářející se hlavovou cystu v mezenchymu

**C** - řez za oblastí optických váčků

**D** - detail snímku C, oranžové šipky označují rozšiřování buněk prechordální destičky do laterální oblasti hlavy, oranžové hvězdičky naznačují vytvářející se hlavové cysty v mezenchymu

**E-G** - sagitální řezy, nakrájela Mgr. Viktorie Psutková

**E** - mediální řez oblastí hlavy

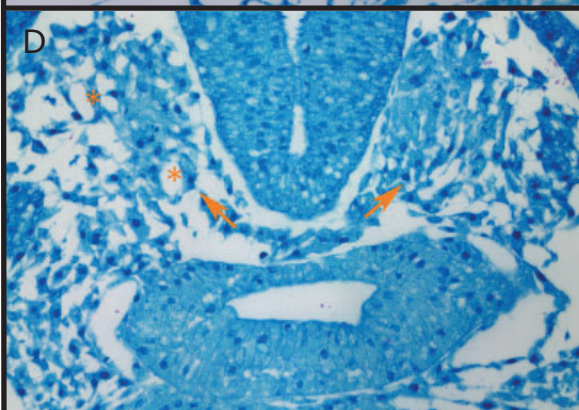
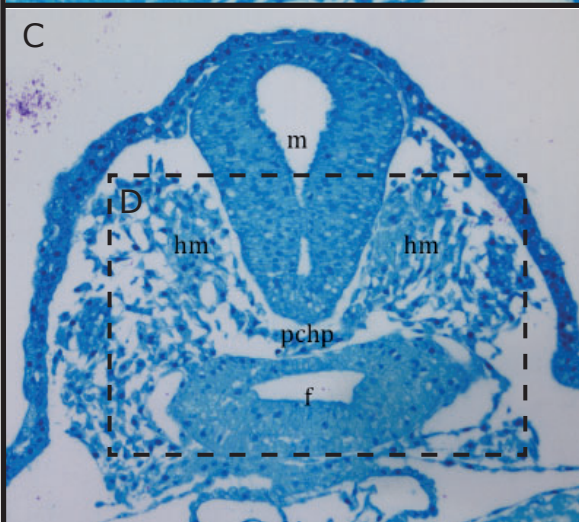
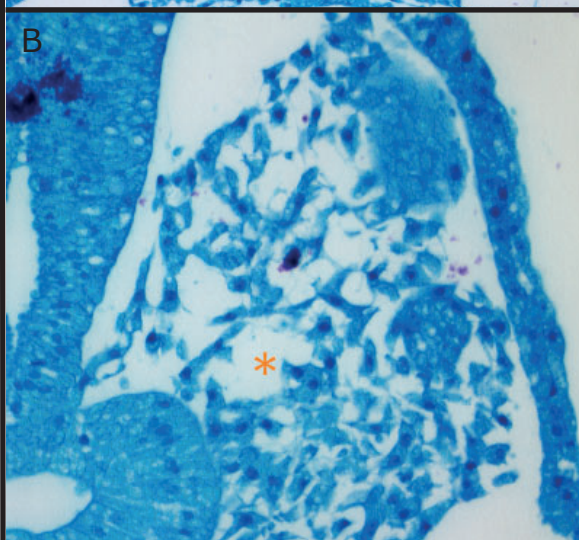
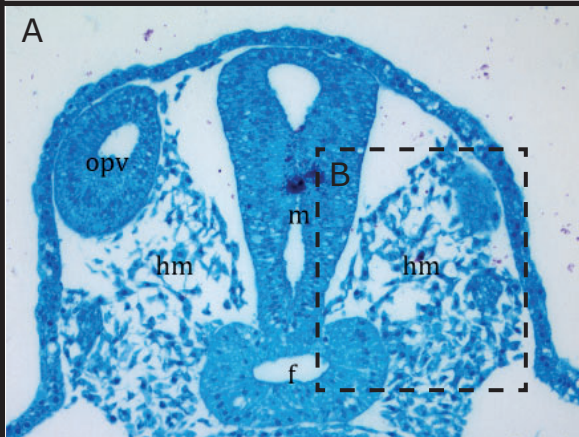
**F** - detail snímku E, oranžová hvězdička označuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky

**G** - laterální řez oblastí hlavy

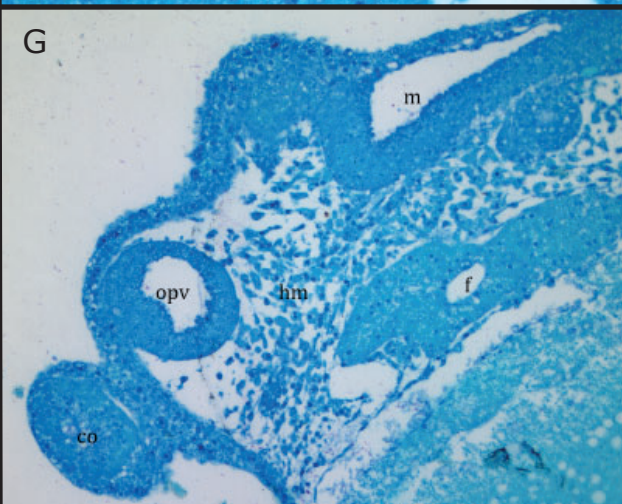
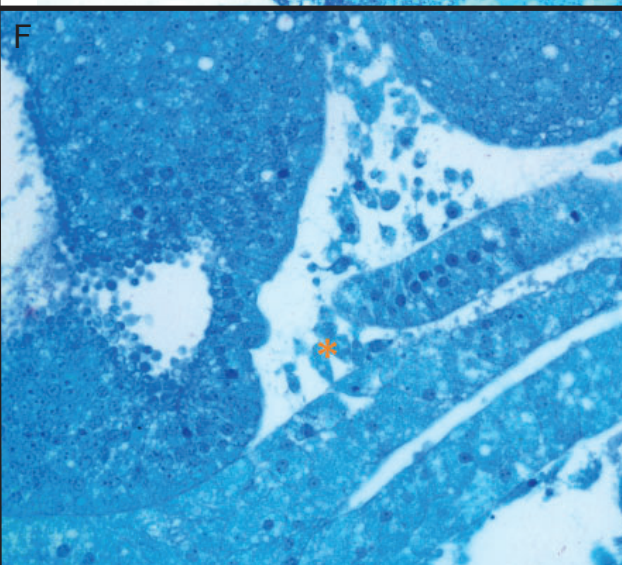
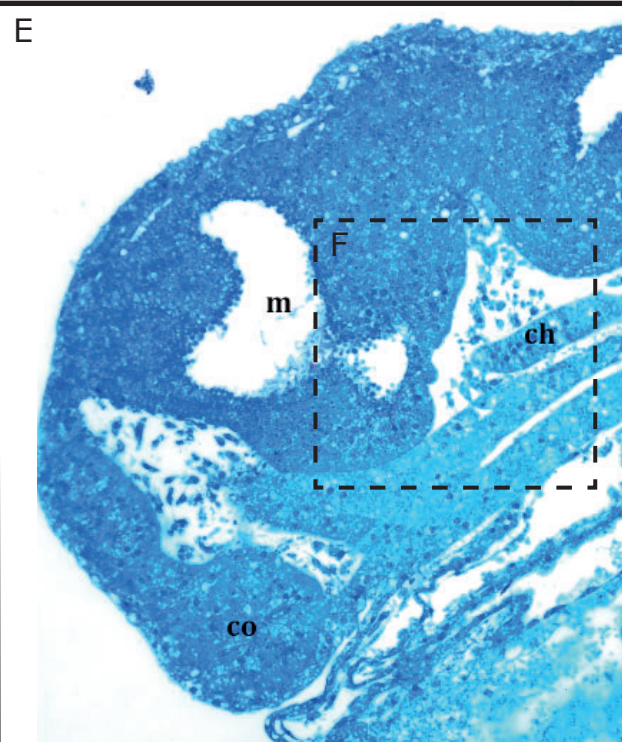
# Pozdní fáze

st. 21

## Frontální řez



## Sagitální řez



**Tabule 24:** Pozdní fáze vývoje prechordální destičky u kostlína, st. 22

**A-D** - frontální řezy

**A** - řez v oblasti optického váčku, a to na pravé straně těla embrya

**B** - detail snímku A, oranžová hvězdička označuje pravou hlavovou kavitu

**C** - řez v oblasti optického váčku, přesněji těsně za ním na levé straně embrya

**D** - detail snímku C, oranžová hvězdička označuje levou hlavovou kavitu

**E-H** - sagitální řezy, hlava směřuje doleva

**E a G** - řez laterální částí hlavy v oblasti optického váčku

**F a H** - detaily snímků E a G, oranžové hvězdičky označují hlavovou kavitu

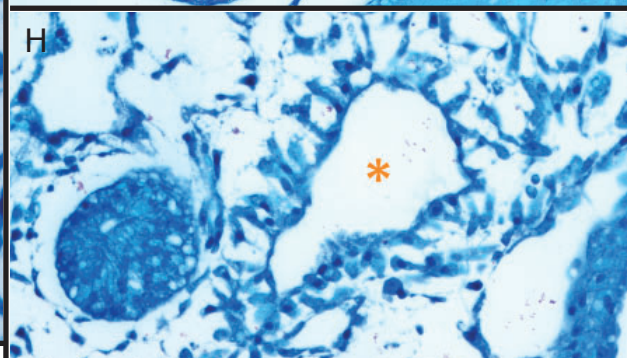
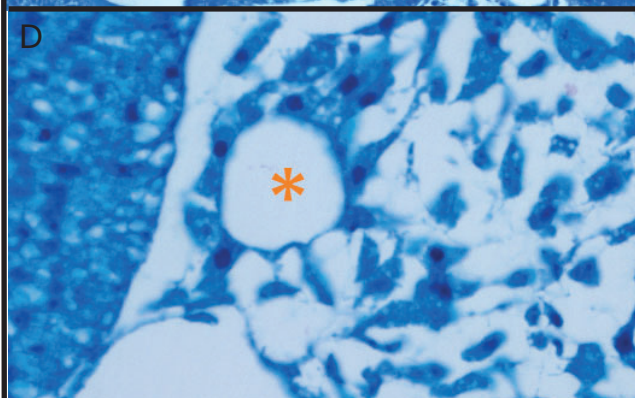
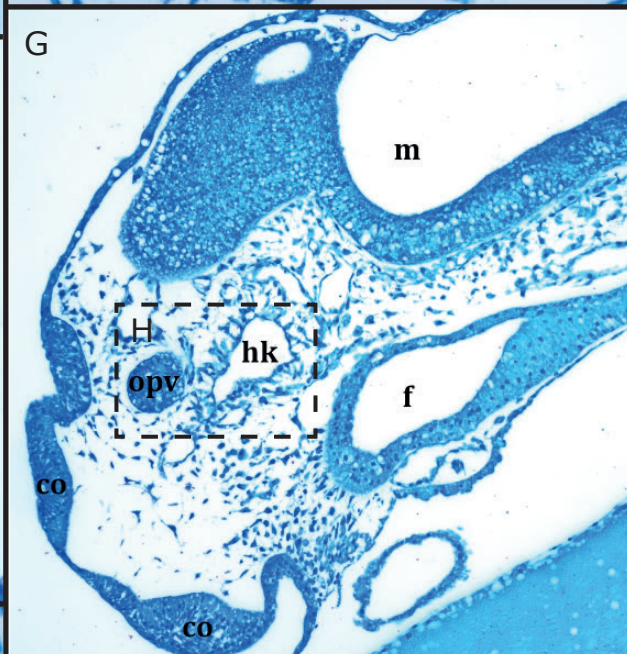
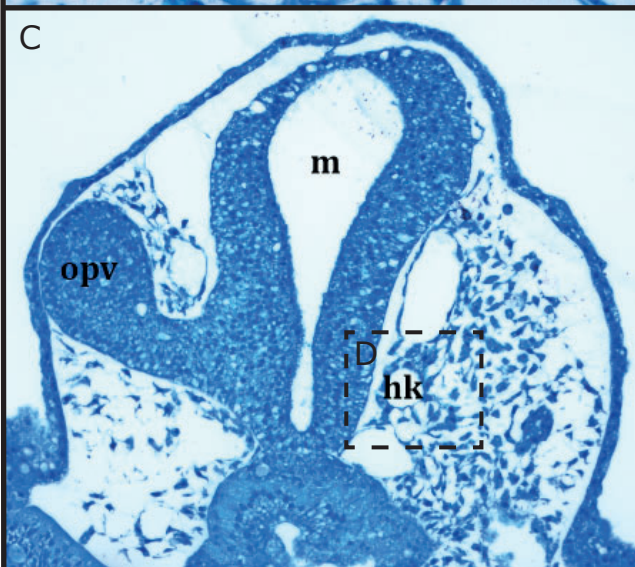
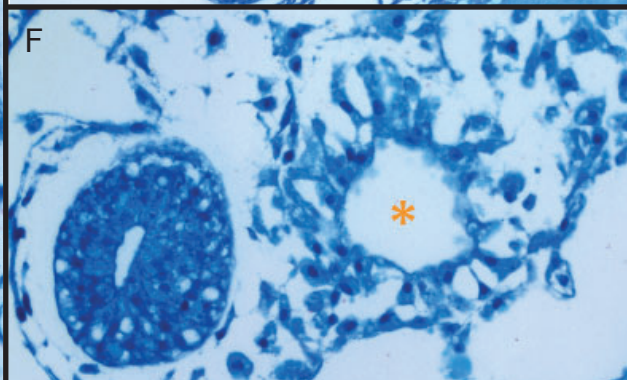
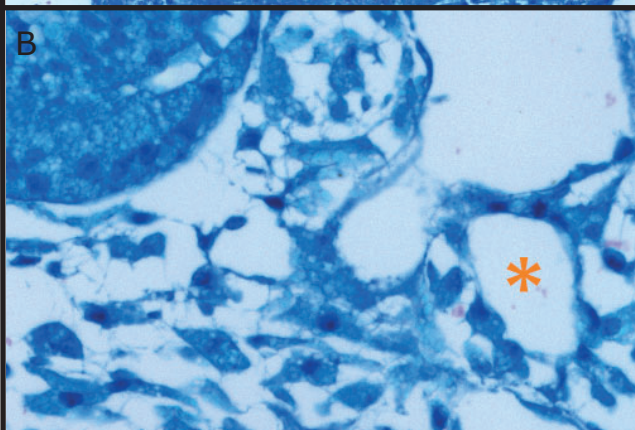
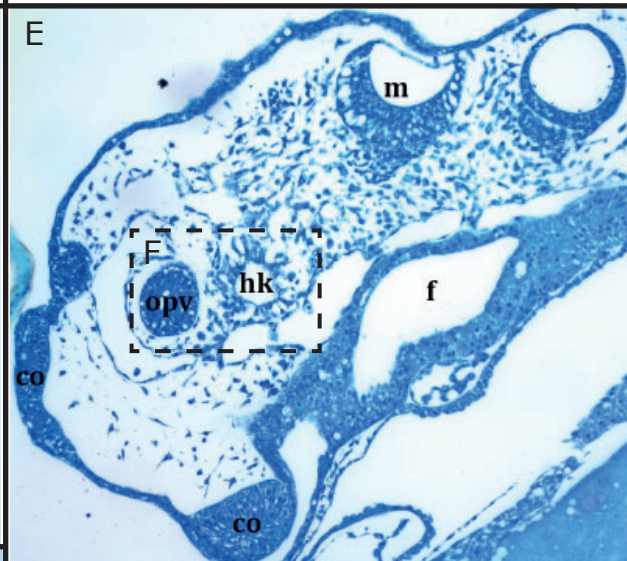
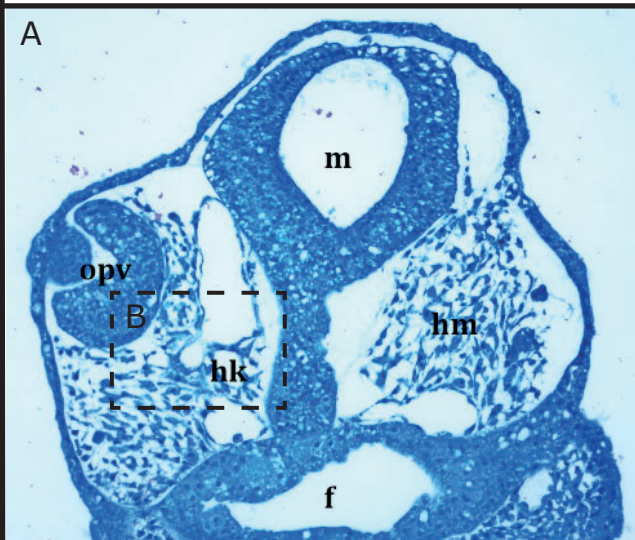


# Pozdní fáze

st. 22

## Frontální řez

## Sagitální řez



**Tabule 25:** Raná fáze vývoje prechordální destičky u bichira, st. 20

**A-D** - frontální řezy, nakrájel a vyfotil Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - řez anteriorní částí hlavy

**B** - řez v oblasti mezi předústním střevem a strunou hřbetní

**C** - detail snímku B, oranžové hvězdičky označují mezenchym ležící v paramediální části mezi předústním střevem a strunou hřbetní

**D** - řez anteriorní částí struny hřbetní

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - mediální řez hlavou embrya

**F** - detail snímku E, žluté tečky ohraničují linii předústního střeva, ale také posteriornější části prvostřeva

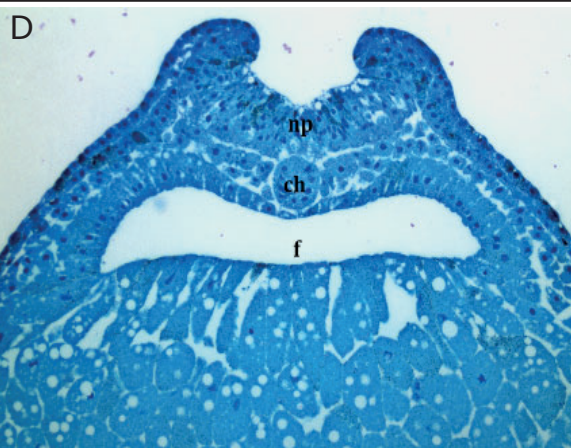
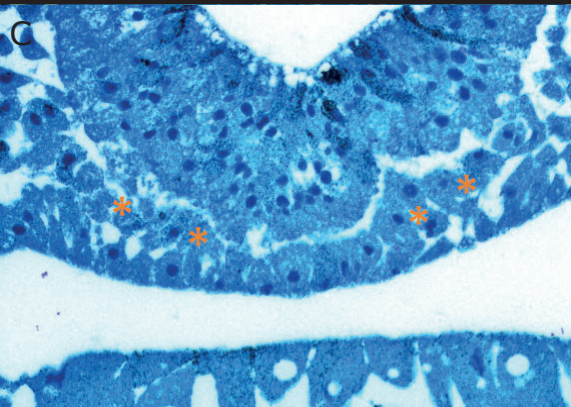
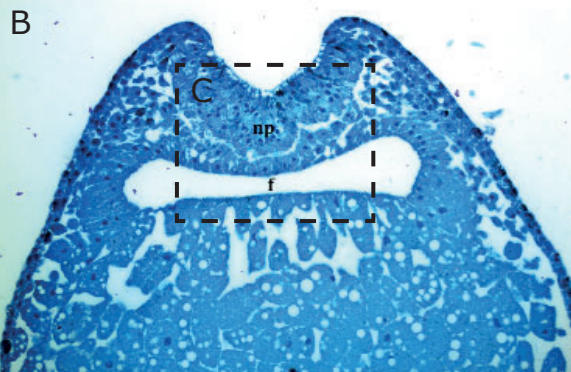
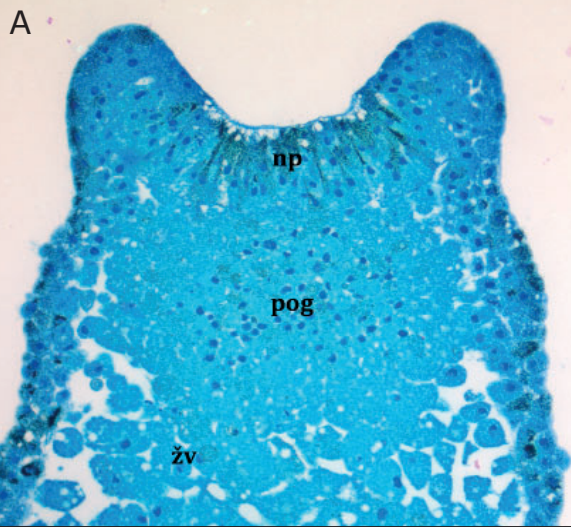
**G** - detail snímku E, červené tečky ohraničují strunu hřbetní a černé tečky spodní stěnu neurální ploténky



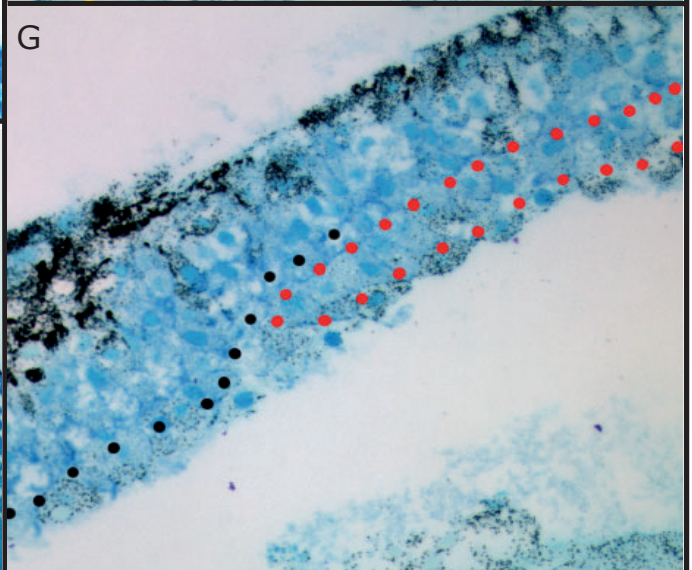
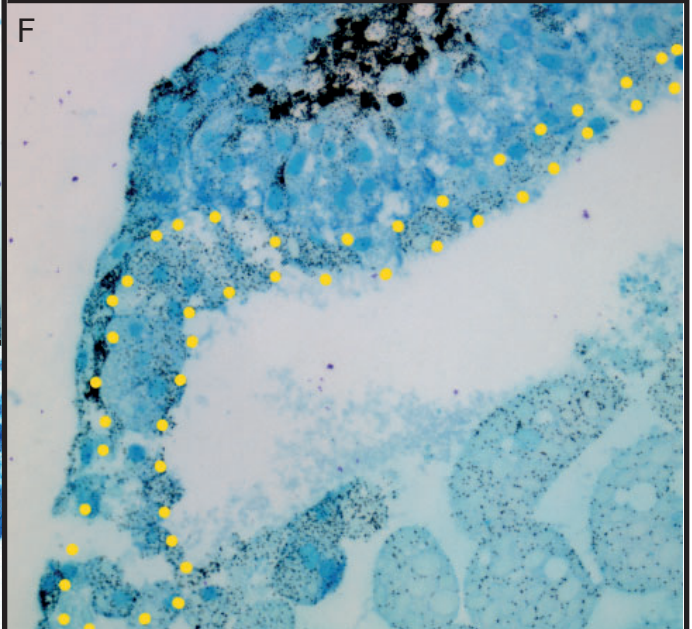
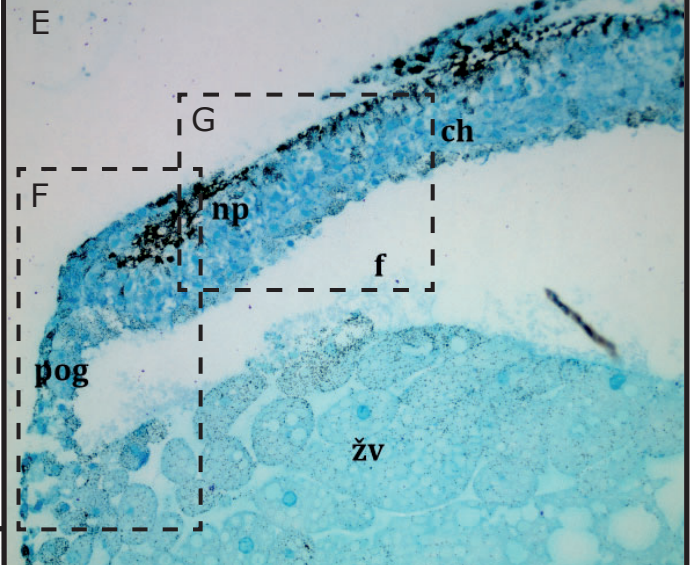
# Raná fáze

st. 20

## Frontální řez



## Mediální řez





**Tabule 26:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u bichira, st. 21

**A-D** - frontální řezy, nakráljel Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - řez anteriorní částí hlavy

**B** - řez oblastí hlavy, těsně před strunou hřbetní

**C** - detail snímku B, žluté tečky ohraničují kontinuální linii prvostřeva, žluté šipky ukazují v mediální části na možné uvolňování mezenchymálních buněk, a to anteriorní prechordální destičky z předústního střeva

**D** - řez přední částí struny hřbetní, žluté tečky ukazují kontinuální linii prvostřeva

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - mediální řez oblastí hlavy

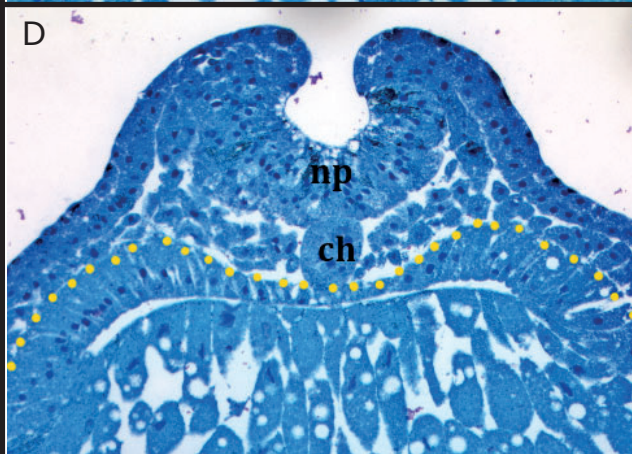
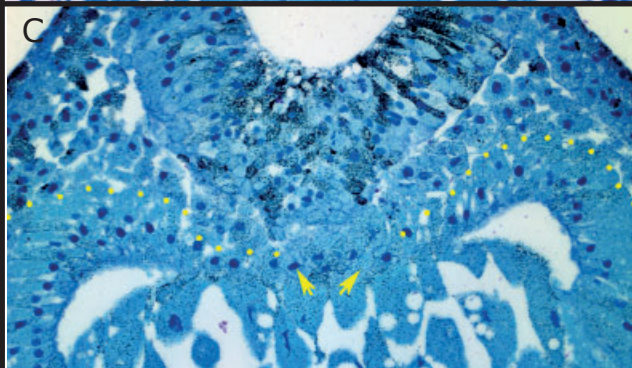
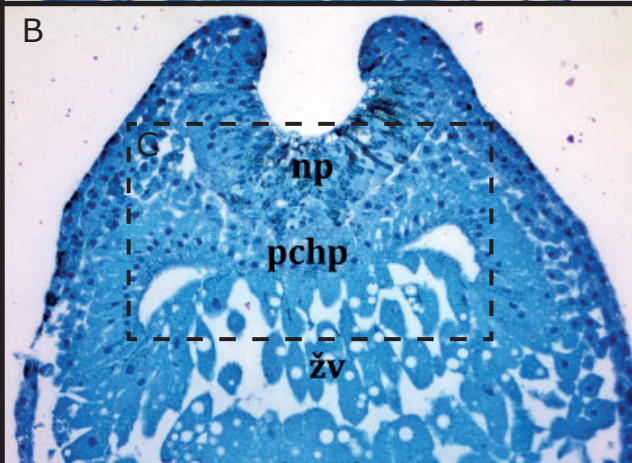
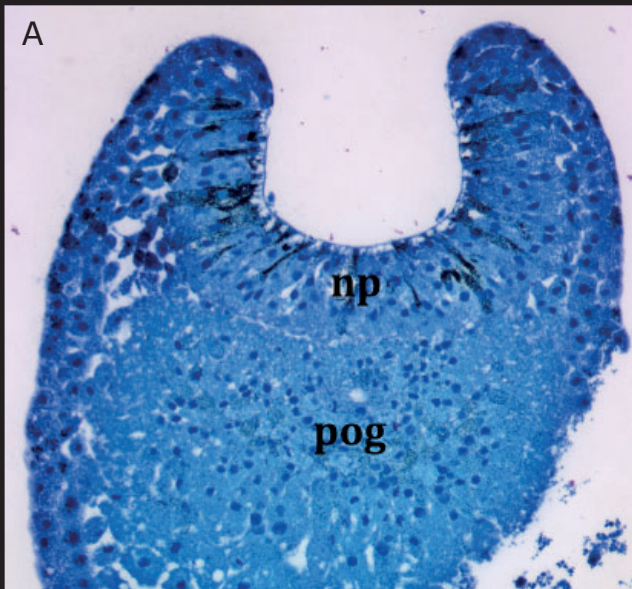
**F** - detail snímku E, žluté tečky ohraničují předústní střevo

**G** - detail snímku E, červená šipka ukazuje uvolňování buněk ze struny hřbetní, tedy vznikající posteriorní populaci buněk prechordální destičky (označené oranžovou hvězdičkou)

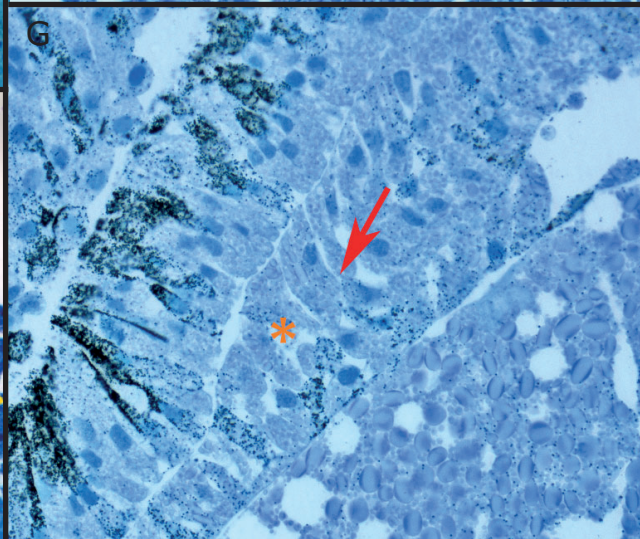
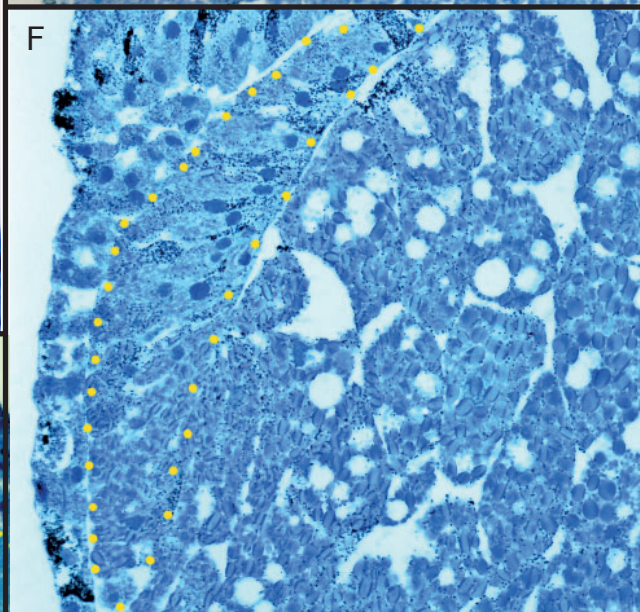
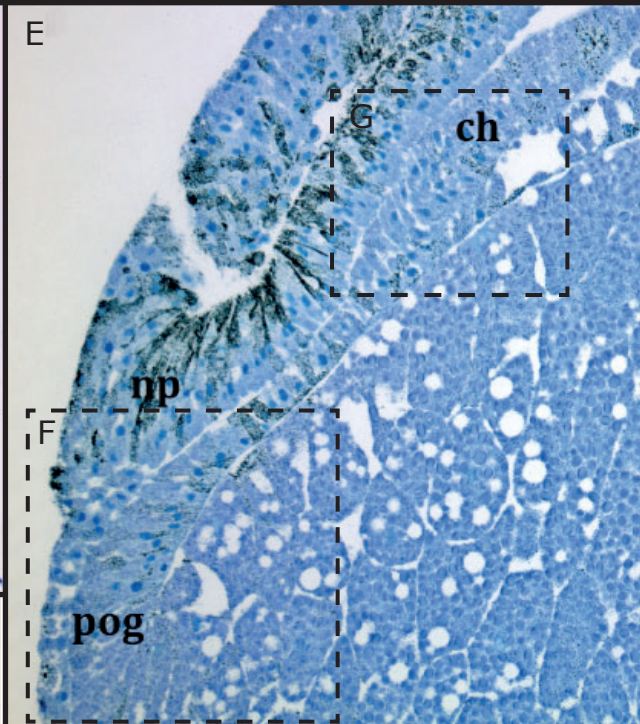
# Střední fáze

st. 21

## Frontální řez



## Mediální řez





**Tabule 27:** Střední fáze u bichira, protilátky **Fibronectin** a **DAPI**, st. 21

**A-B** - imunohistochemický sagitální řez

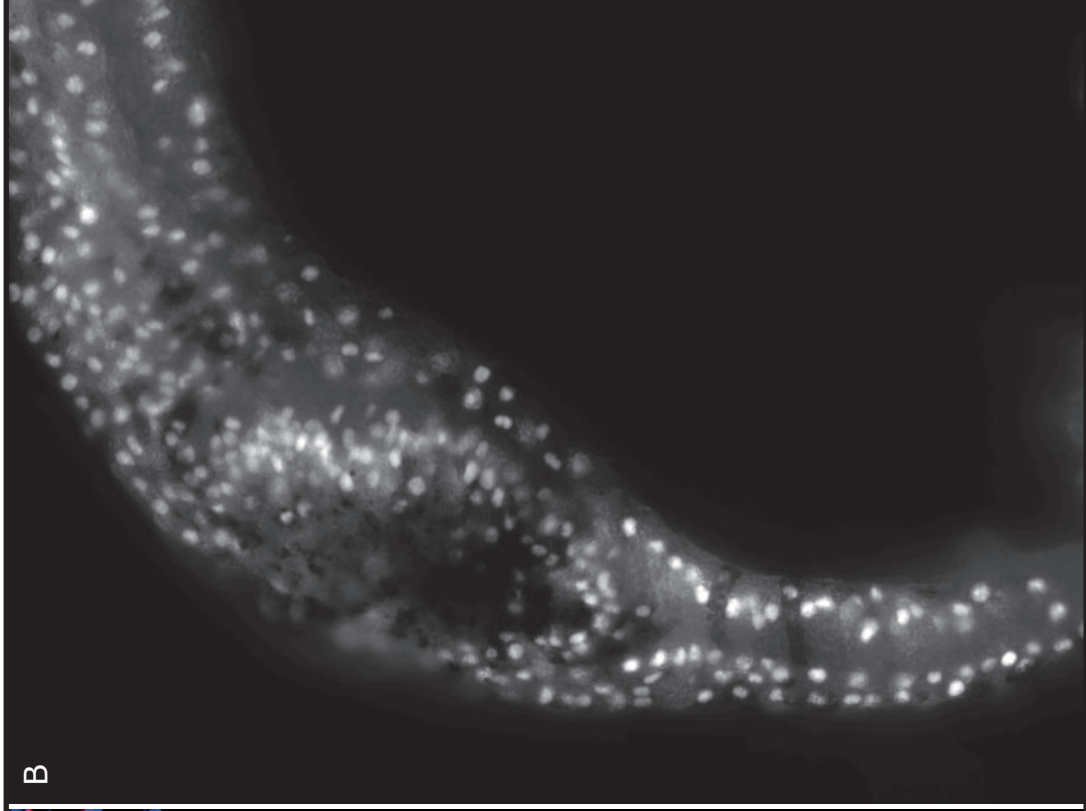
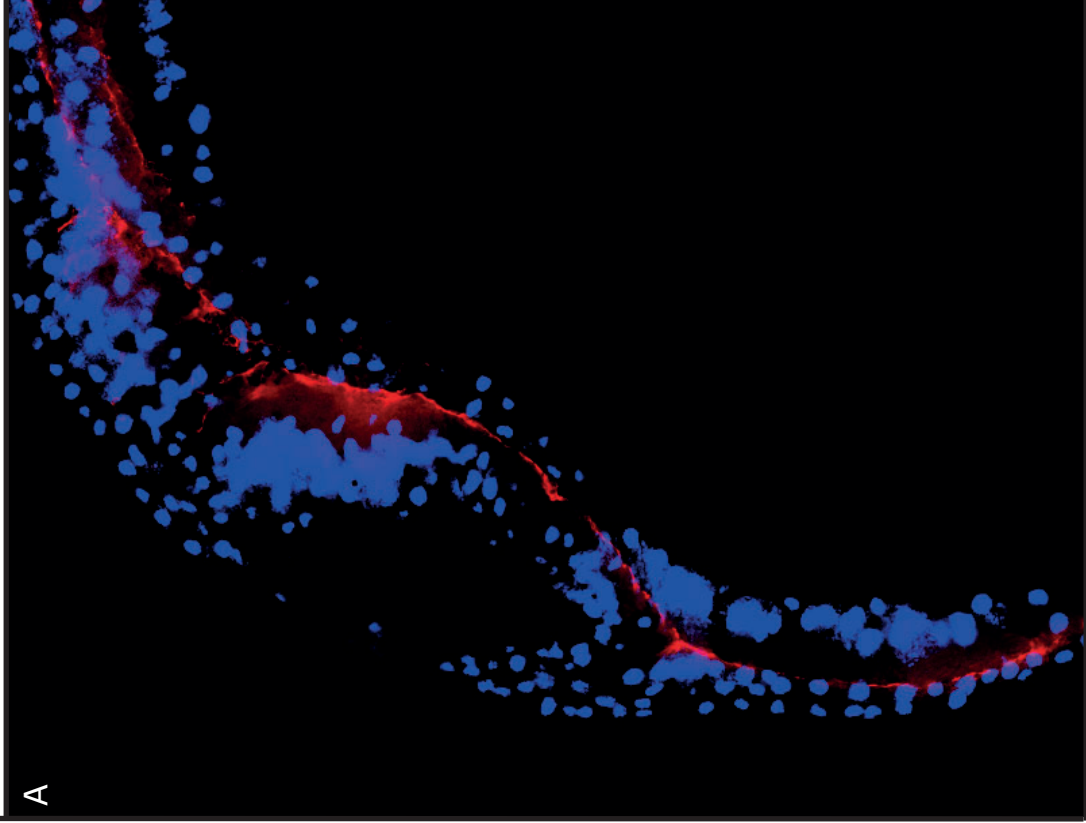
**A** - mediální řez oblastí hlavy, červená protilátka fibronectin znázorňuje bazální laminu u anteriorní části předústního střeva, u posteriorní části předústního střeva a struny hřbetní jsou buňky rozvolněné, není tu kontinuální bazální lamina

**B** - stejný snímek jako A, pro lepší viditelnost jednotlivých struktur v oblasti hlavy pomocí protilátky DAPI



Střední fáze

st. 21



**Tabule 28:** Střední fáze vývoje prechordální destičky u bichira, st. 22

**A-C** - frontální řezy, nakráljel Mgr. Jan Štundl, Ph.D.

**A** - řez anteriorní částí hlavy

**B** - řez anteriorní částí hlavy na posterioním/neurálním konci předústního střeva

**C** - detail snímku B, žluté šipky označují vznik anteriorní prechordální destičky z předústního střeva, oranžová hvězdička označuje anteriorní populaci buněk prechordální destičky

**D-F** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**D** - mediální řez oblastí hlavy

**E** - detail snímku D, žluté šipky označují směr možného uvolňování mezenchymálních buněk z předústního střeva

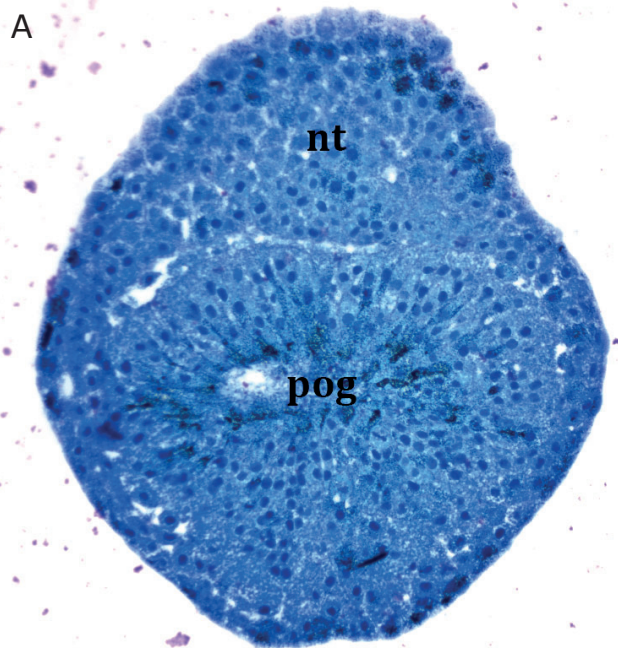
**F** - detail snímku D, červená šipka naznačuje směr uvolňování buněk ze struny hřbetní, oranžová hvězdička označuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky

# Střední fáze

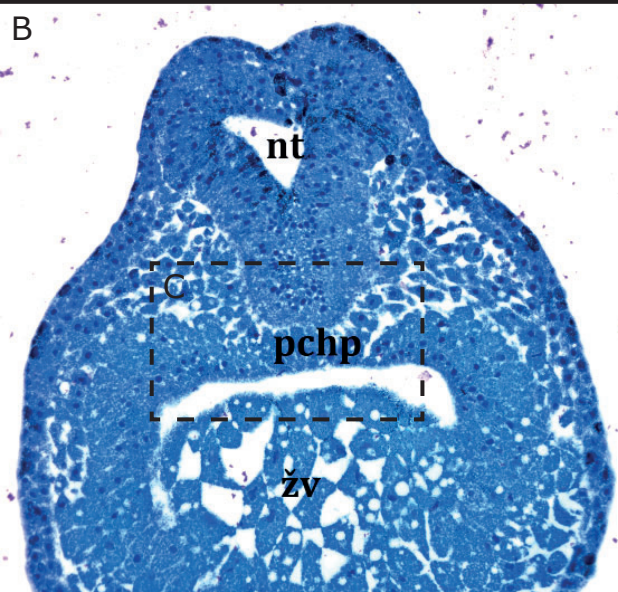
st. 22

## Frontální řez

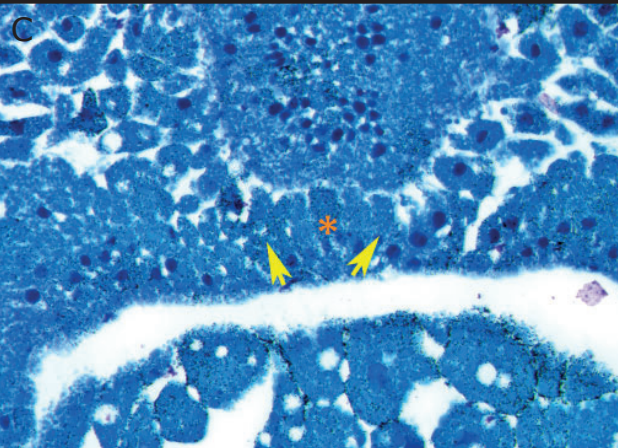
A



B

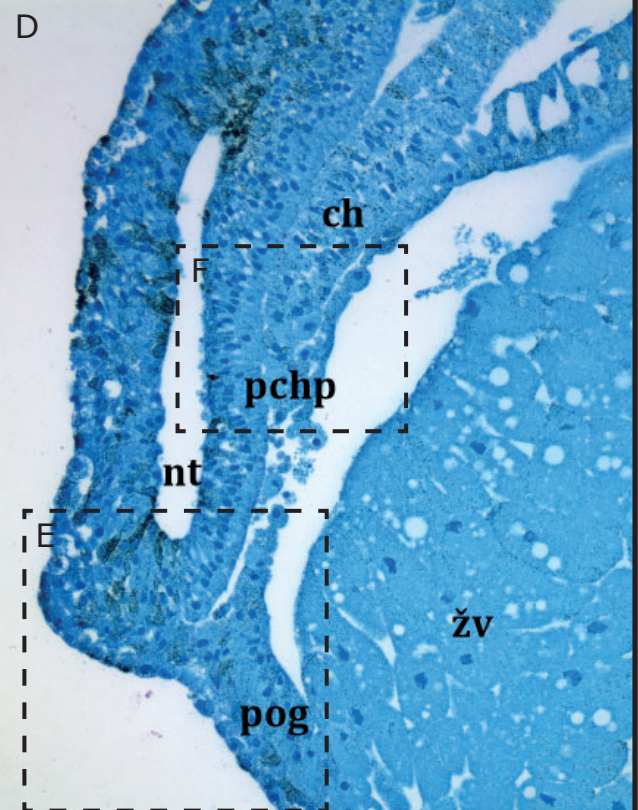


C

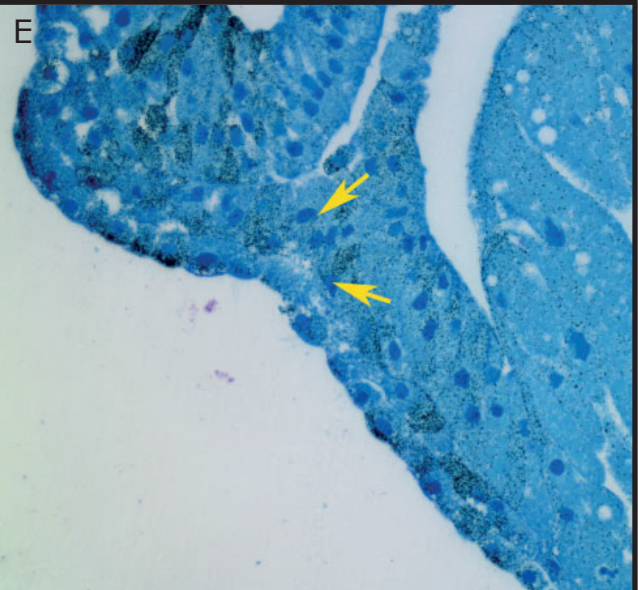


## Mediální řez

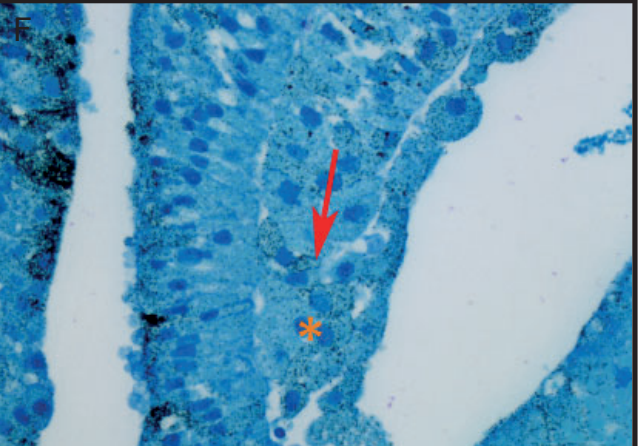
D



E



F





**Tabule 29:** Střední fáze u bichira, protilátky **Fibronectin** a **DAPI**, st. 22+

**A-D** - imunohistochemický sagitální řez

**A** - mediální řez oblastí hlavy

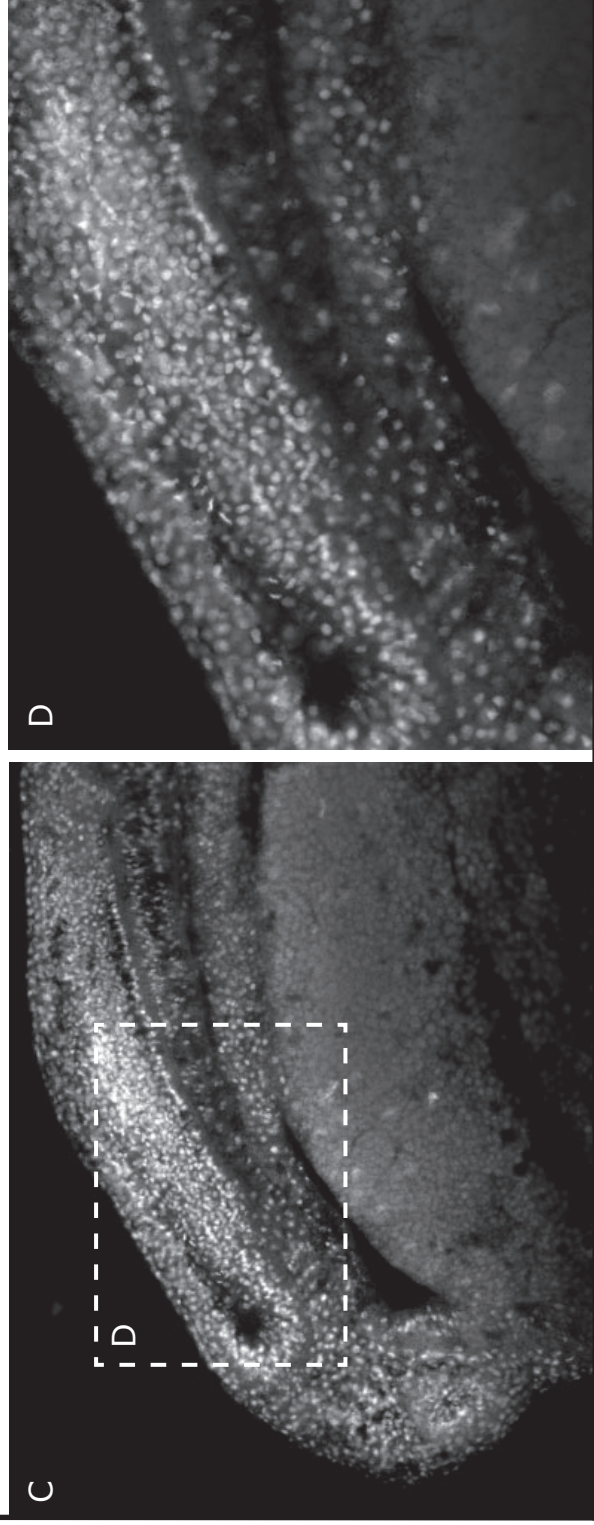
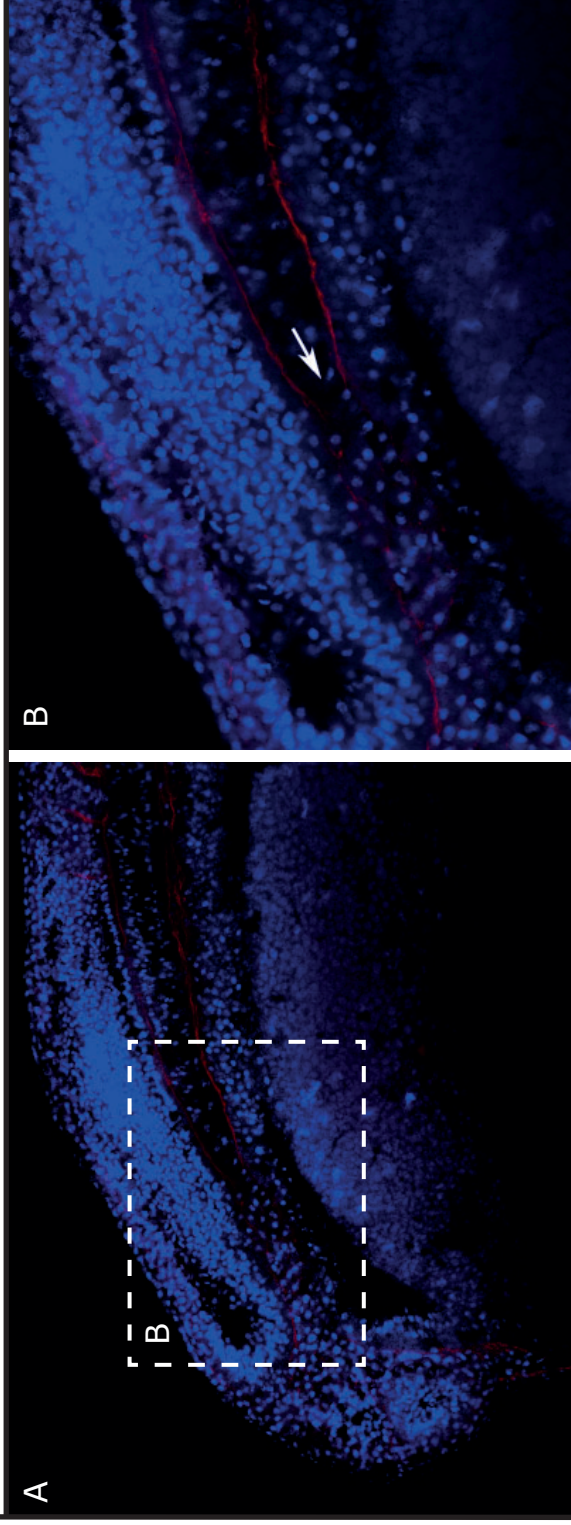
**B** - detail snímku A na oblast v anteriorní části struny hřbetní, která není ohraničená ve své anteriorní části, neboť se z ní uvolňují buňky prechordální destičky

**C** - stejný snímek jako A, pouze s protilátkou DAPI

**D** - detail snímku C na oblast v anteriorní části struny hřbetní

**Střední fáze**

**st. 22+**



**Tabule 30:** Střední fáze vývoje prechodální destičky u bichira, st. 23

**A-D** - frontální řezy

**A** - řez anteriorní částí hlavy, žluté šipky ukazují uvolňování buněk anteriorní prechordální destičky z předústního střeva

**B** - řez v posteriorní/neurální oblasti předústního střeva

**C** - detail snímku B, žluté šipky ukazují uvolňování buněk z předústního střeva

**D** - řez přední částí struny hřbetní

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - řez mediální oblastí hlavy

**F** - detail snímku E, žluté šipky ukazují uvolňování buněk z předústního střeva

**G** - detail snímku E, červené tečky ohraničují strubu hřbetní a oranžová hvězdička posteriorní populaci buněk prechordální destičky

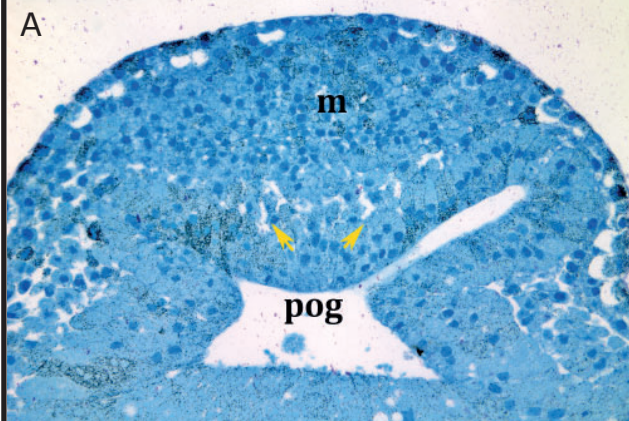


# Střední fáze

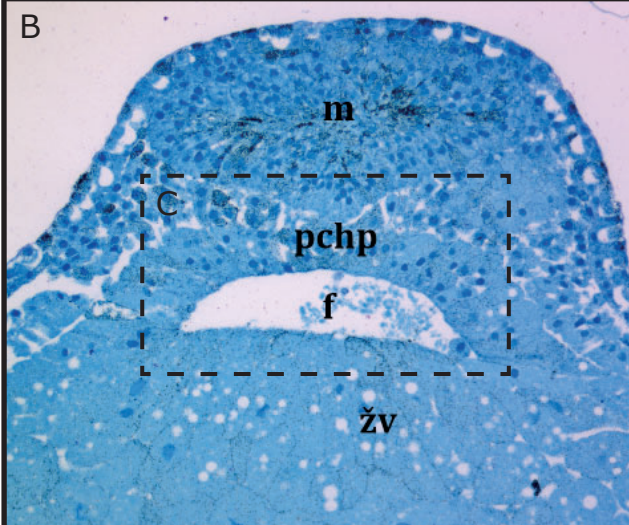
st. 23

## Frontální řez

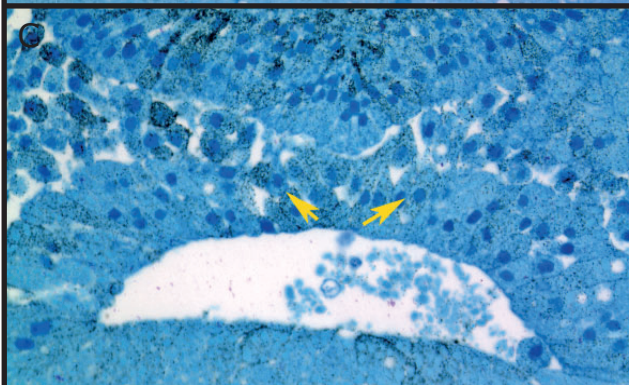
A



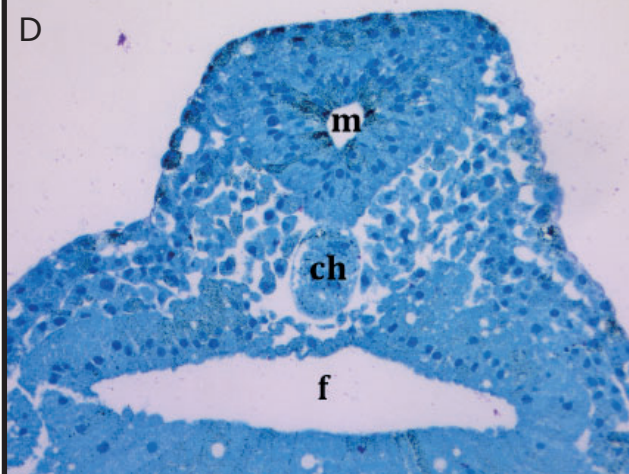
B



C

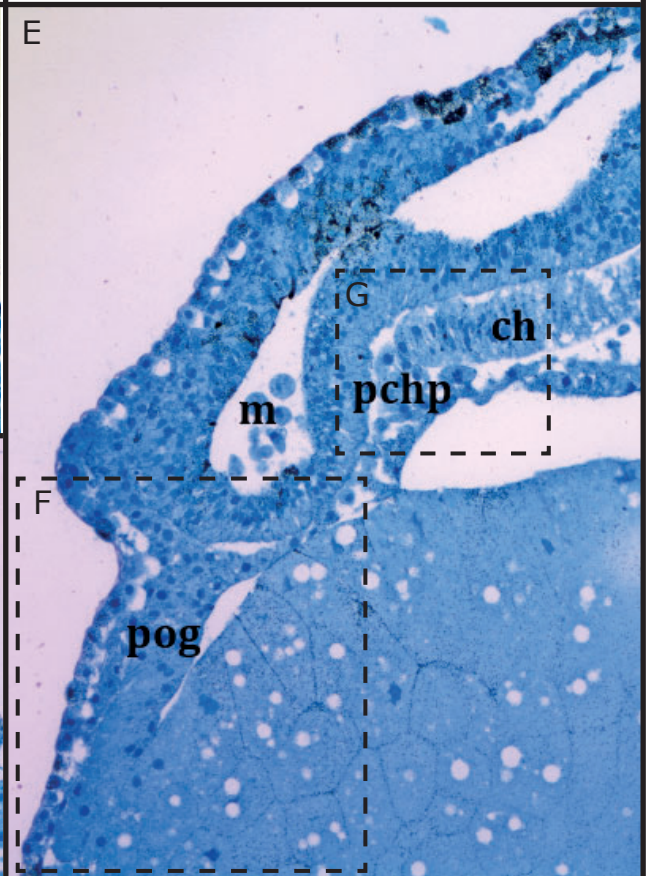


D

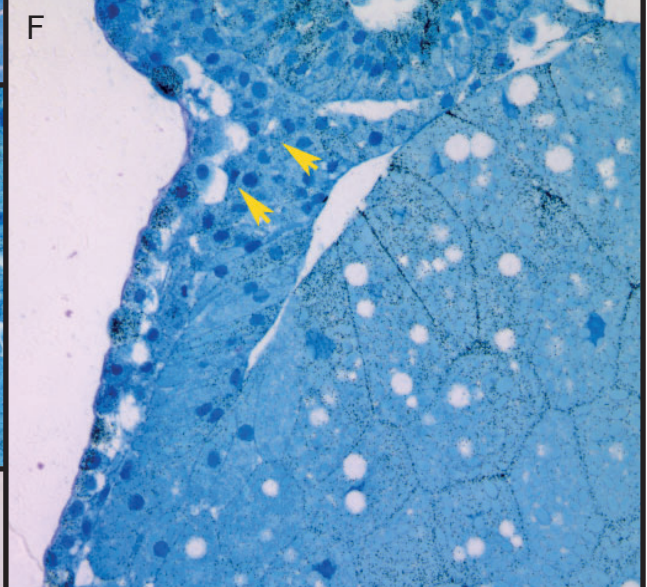


## Mediální řez

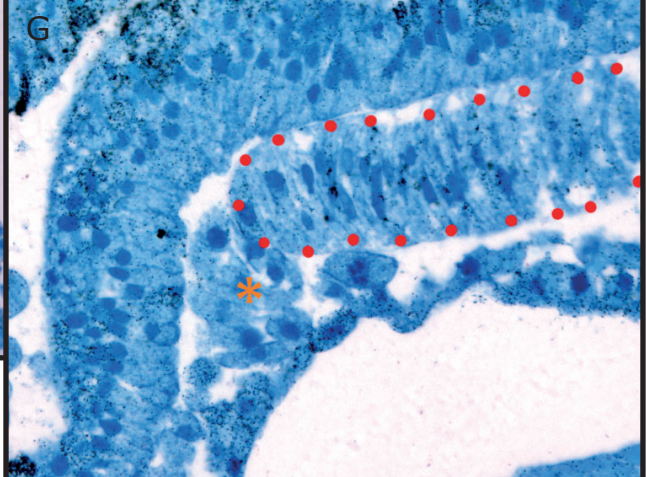
E



F



G



**Tabule 31:** Pozdní fáze vývoje prechodální destičky u bichira, st. 24

**A-D** - frontální řezy

**A** - řez anteriorní částí hlavy

**B** - řez v oblasti před strunou hřbetní

**C** - detail snímku B, žluté tečky ohraničují linii prvostřeva, oranžové šipky ukazují rozšiřování buněk posteriorní prechordální destičky do laterální části hlavy

**D** - řez anteriorní částí struny hřbetní

**E-G** - mediální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - řez mediální oblastí hlavy

**F** - detail snímku E, černé tečky označují těsnou linii mezi spodní částí mozku a svrchní částí stěny orálního střeva a prvostřeva

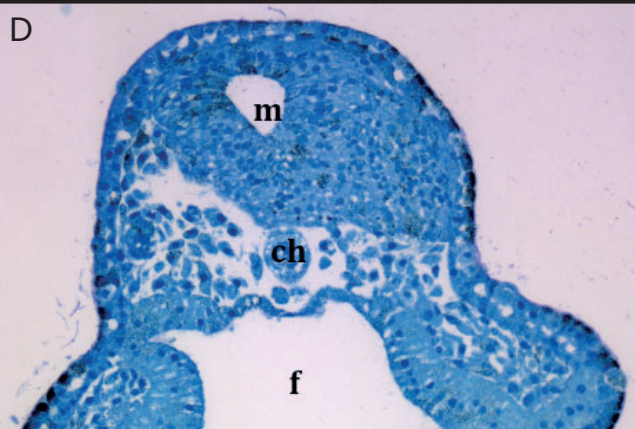
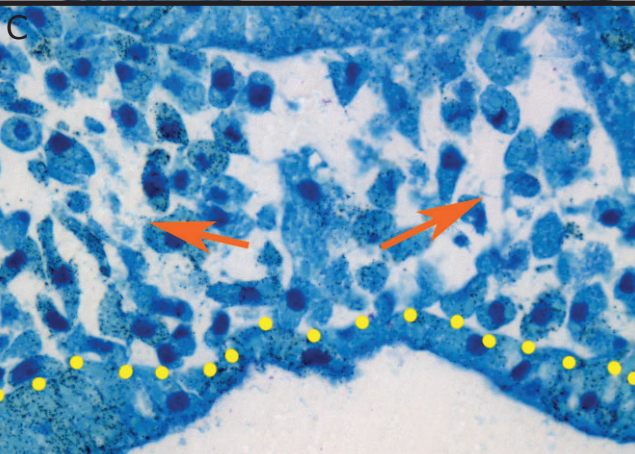
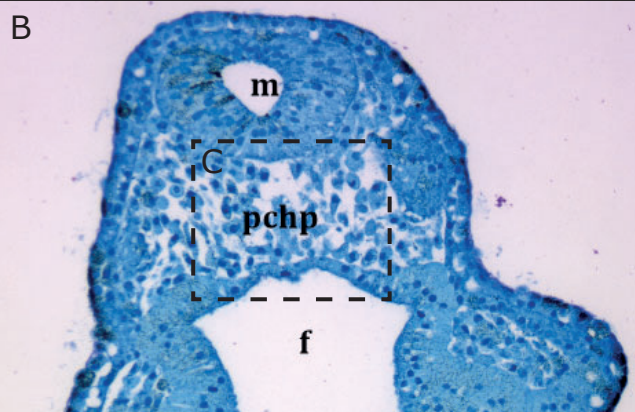
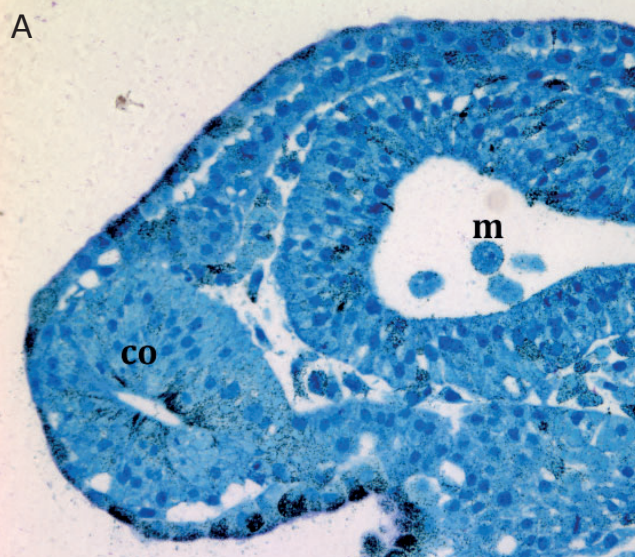
**G** - detail snímku E, červené tečky ohraničují strunu hřbetní a oranžová hvězdička označuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky



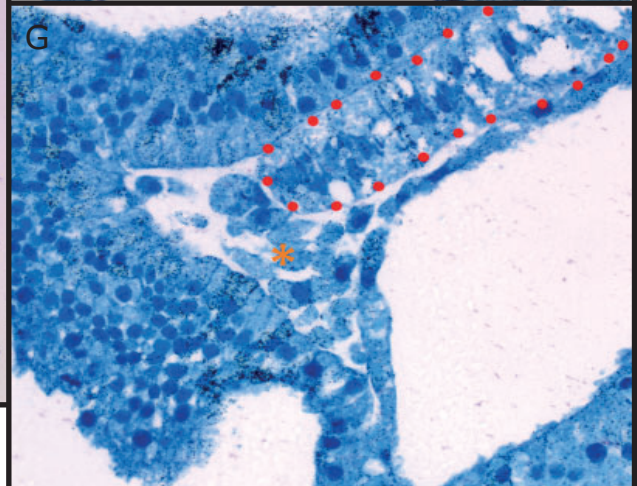
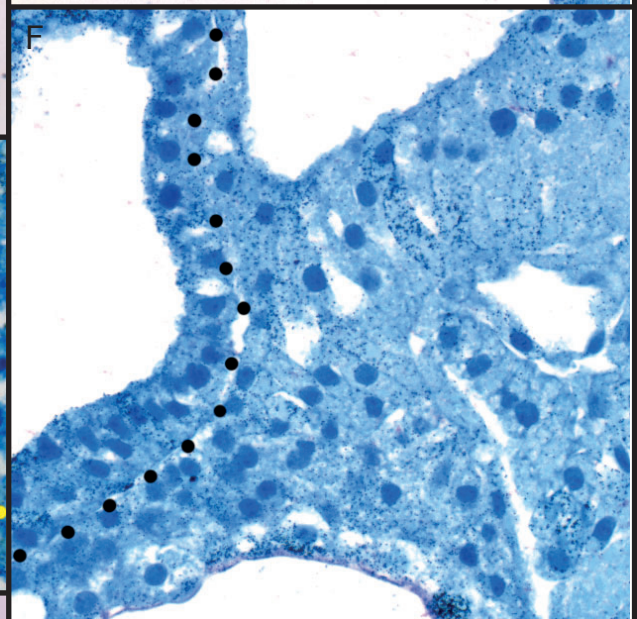
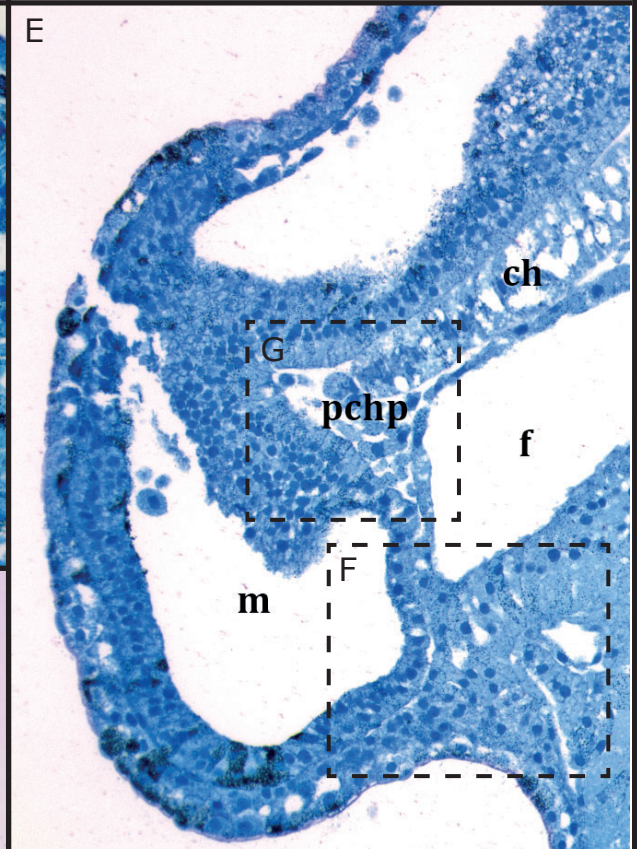
# Pozdní fáze

st. 24

## Frontální řez



## Mediální řez





**Tabule 32:** Pozdní fáze vývoje prechodální destičky u bichira, st. 25

**A-D** - horizontální řezy, hlava směřuje doleva

**A** - řez spodní částí hlavy

**B** - řez v oblasti optického váčku

**C** - detail snímku B, oranžové šipky označují rozšiřování buněk posteriorní prechordální destičky do laterální části těla

**D** - řez v oblasti optického váčku, výše než předchozí řez

**E** - detail snímku D, oranžové šipky označují rozšiřování buněk posteriorní prechordální destičky do laterální části těla

**F-H** - sagitální řezy, hlava směřuje doleva

**F** - řez laterální částí hlavy

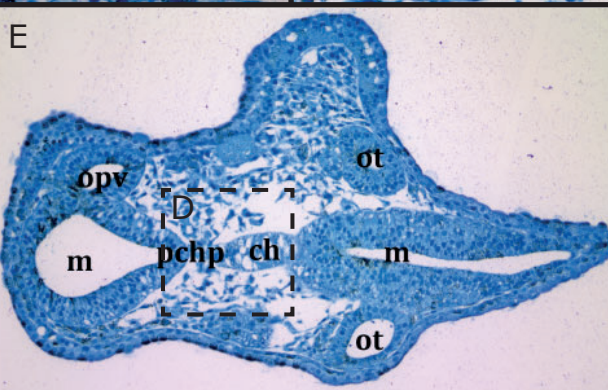
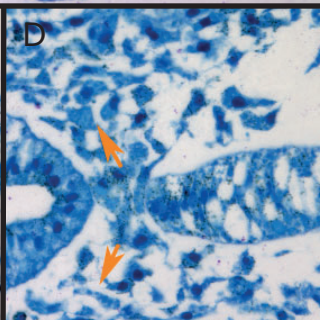
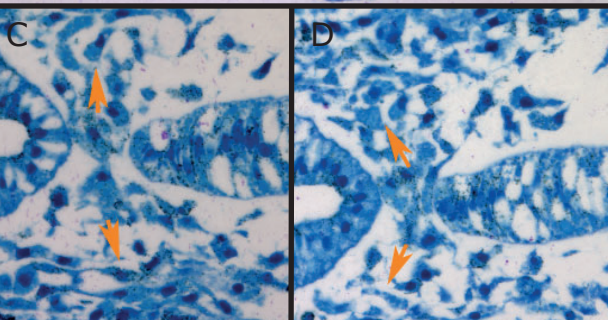
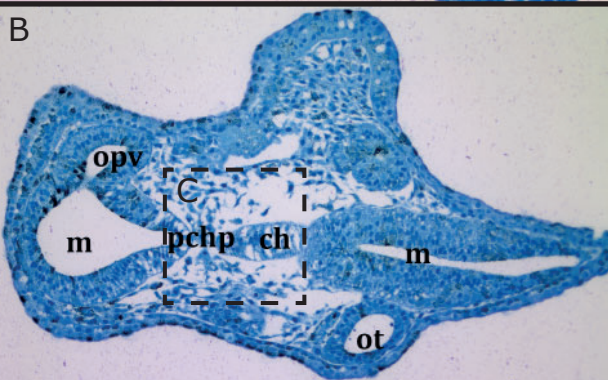
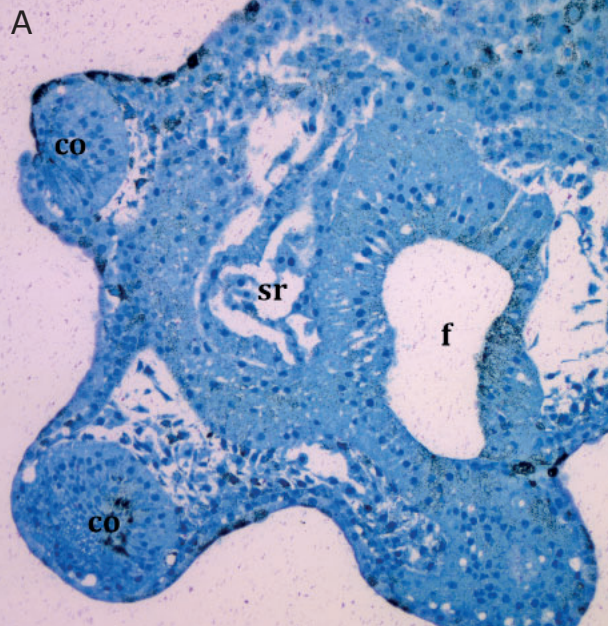
**G** - řez mediální částí hlavy

**H** - detail snímku G, červené tečky ohraničují strunu hřbetní a oranžová hvězdička posteriorní populaci buněk prechordální destičky

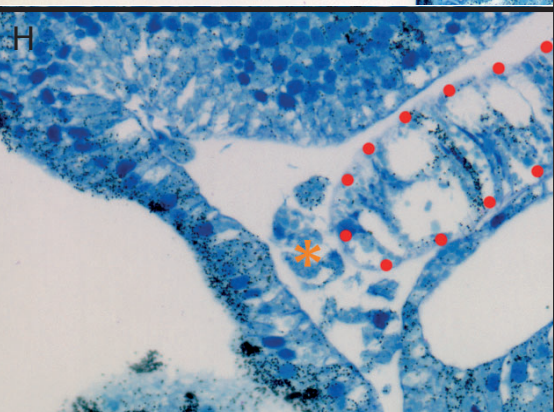
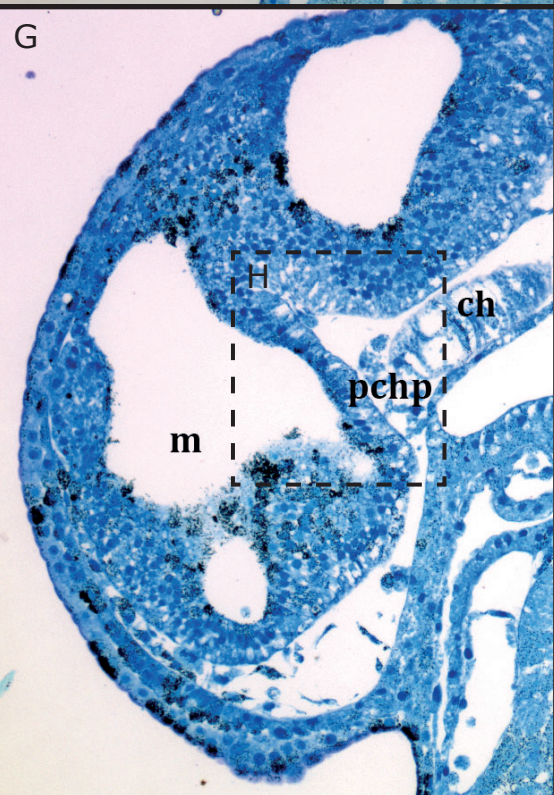
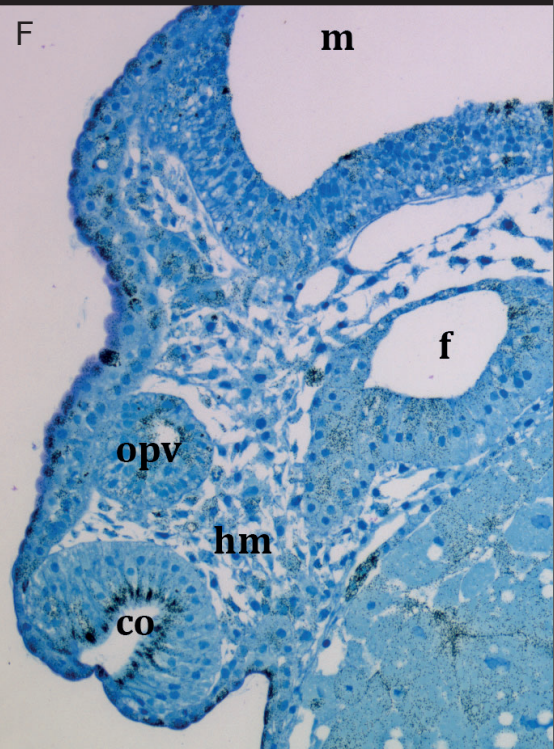
# Pozdní fáze

st. 25

## Horizontální řez



## Sagitální řez



**Tabule 33:** Pozdní fáze u bichira, protilátky **Fibronektin** a **DAPI**, st. 25

**A-D** - imunohistochemický sagitální řez, nakrájela Mgr. Viktorie Psutková

**A** - mediální řez oblastí hlavy

**B** - detail snímku A na oblast v přední části struny hřbetní, která už je ohraničená, tedy se z ní už buňky prechordální destičky neuvolňují

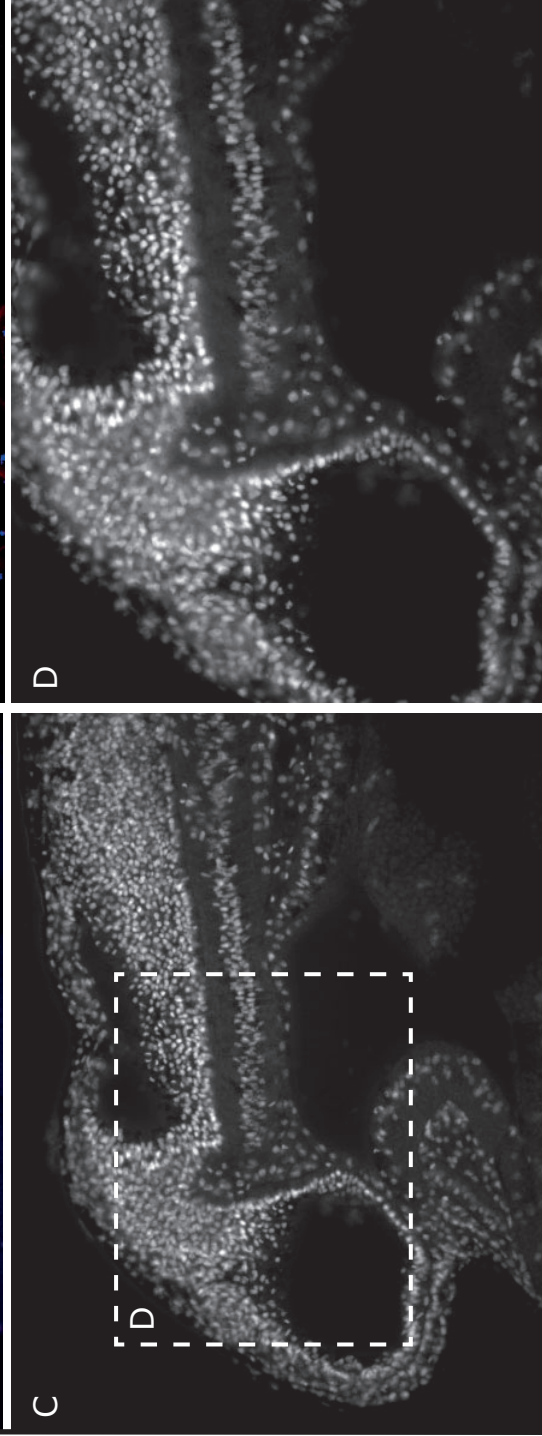
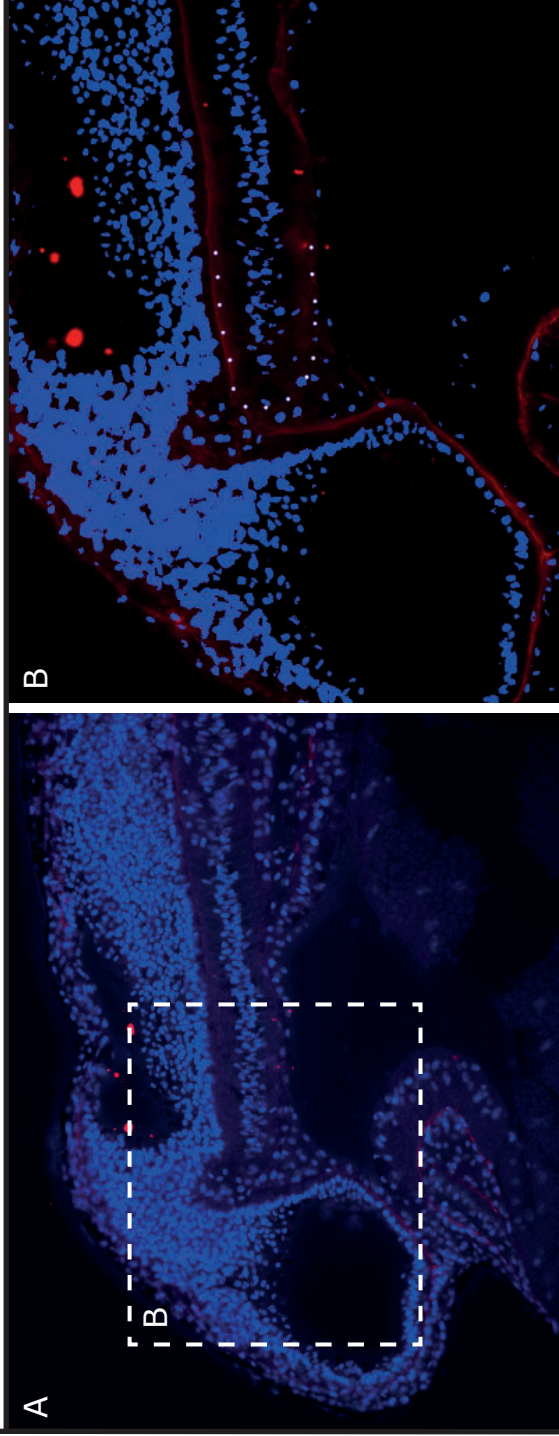
**C** - stejný snímek jako A, pouze s protilátkou DAPI

**D** - detail snímku C na oblast v anteriorní části struny hřbetní



**Pozdní fáze**

**st. 25**



**Tabule 34:** Pozdní fáze vývoje prechodální destičky u bichira, st. 26

**A-D** - frontální řezy

**A** - řez vede oblastí před strunou hřbetní

**B** - detail snímku A, oranžová hvězdička označuje posteriorní prechordální destičku

**C** - řez nejanteriornější částí struny hřbetní a jelikož není řez čistě frontální, je vidět i posteriorní populace buněk prechordální destičky

**D** - detail snímku C, oranžové šipky označují směr rozšiřování buněk prechordální destičky do laterální části hlavy

**E-H** - sagitální řezy, hlava směřuje doleva

**E** - řez laterální částí hlavy v oblasti cementového orgánu a optického váčku

**F** - detail snímku E, žluté tečky ohraničují cementový orgán, černé tečky ohraničují optický váček a mozek

**G** - řez mediální částí hlavy

**H** - detail snímku G, červené tečky ohraničují strunu hřbetní a černé tečky mozek, oranžová hvězdička označuje posteriorní populaci buněk prechordální destičky



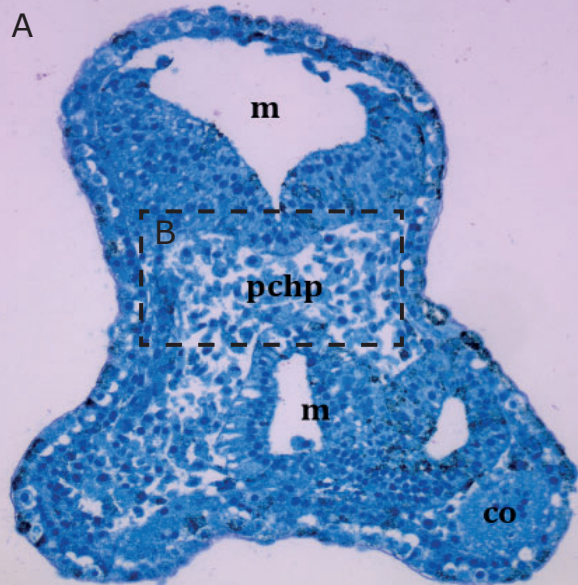
# Pozdní fáze

st. 26

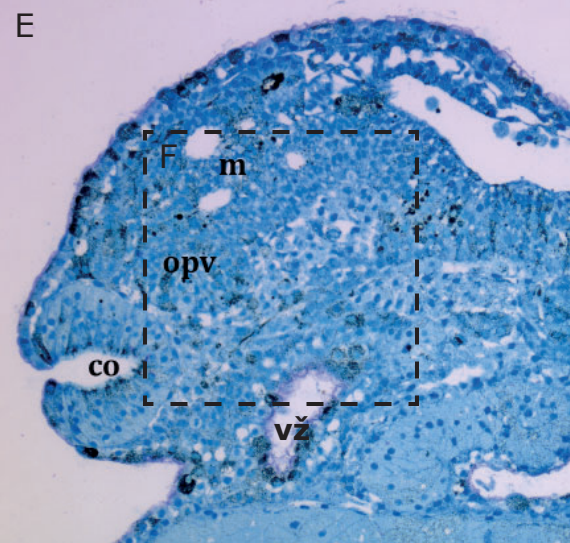
## Frontální řez

## Sagitální řez

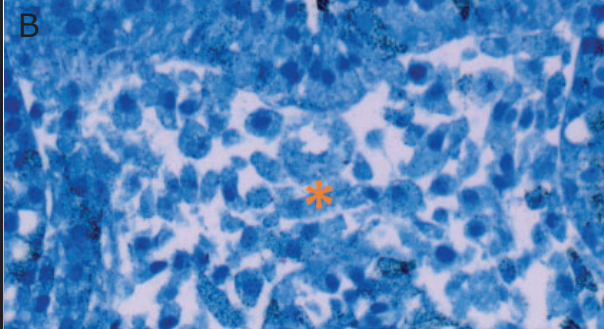
A



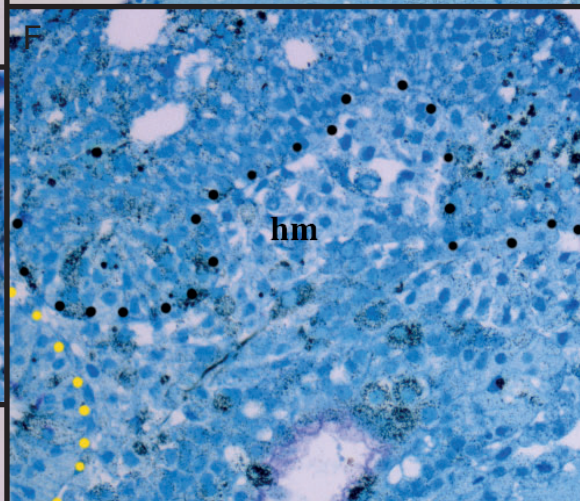
E



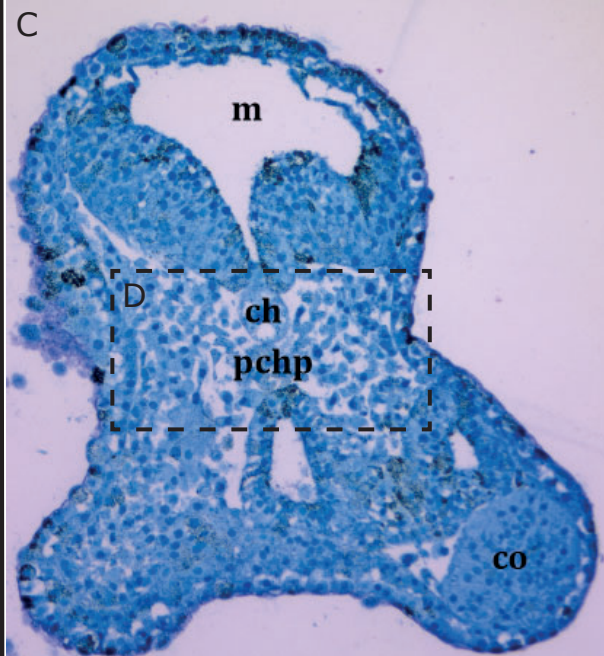
B



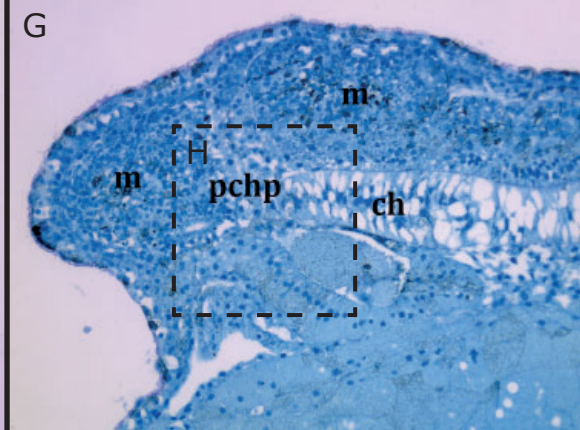
F



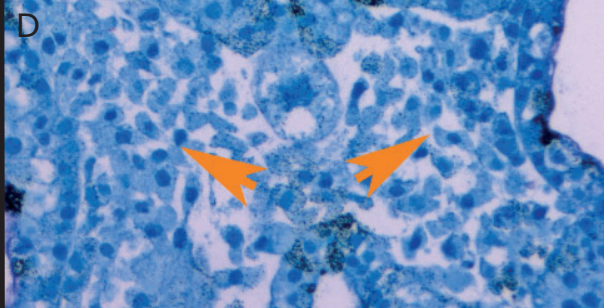
C



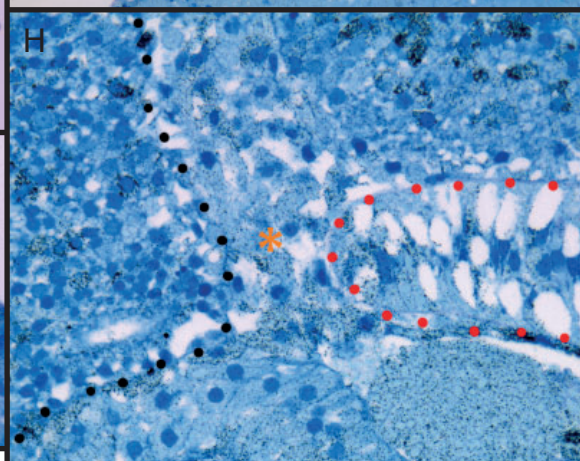
G



D



H





## 5. Diskuze

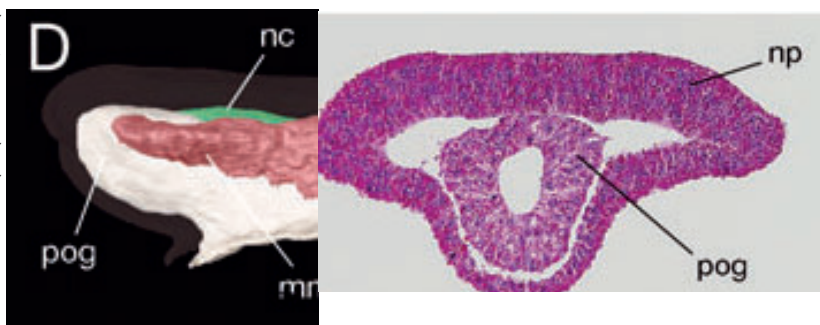
Vznik tzv. nové hlavy byl důležitým evolučním krokem nás obratlovců, a prechordální destička je jednou z unikátních embryonálních struktur naší nové hlavy. Cílem této diplomové práce bylo popsat vývoj populace buněk prechordální destičky u zástupců tzv. paprskoploutvých ryb a zasadit ho do kontextu vývoje předústního střeva (Minařík a kol., 2017).

### 5.1. Vývoj prechordální destičky v kontextu předústního střeva

#### 5.1.1 Raná fáze - v nejanteriornější části hlavy se nachází pouze epitel předústního střeva, žádný mezenchym prechordální destičky

Většina autorů se u vývoje prechordální destičky detailně nezabývá vývojovou fází, která předchází jejímu vzniku. Když už je její vznik popisován, je zahrnut do gastrulačních procesů, tedy velmi raného vývoje embrya (kupř. Meier, 1981; Amaya a kol., 1993; Kimmel a kol., 1995; Robb a Tam, 2004). U embryí dánia je při gastrulaci popisován tzv. polster, který podle autorů vzniká z mezendodermální anteriorní prechordální destičky (Kimmel a kol., 1995). U embryí drápatky je dokonce prechordální destička/mezoderm popisovány dříve než struna hřbetní, která se zanořuje při gastrulaci až po ní (Amaya a kol., 1993). U embryí kuřete (Meier, 1981) a myši (Robb a Tam, 2004) je prechordální destička popisovaná podobně jako u drápatky. To by tedy znamenalo, že už při gastrulaci se v oblasti hlavy vytváří rostrální, axiální hlavový mezoderm nebo mezenchym. Při pohledu ale na ranou neurulaci jesetera se v oblasti hlavy, i v té nejanteriornější, žádný mezoderm ani mezenchym nevyskytuje, není tam pro něj žádný volný prostor (**Tab.1B, 1D**). Podobnou situaci můžeme pozorovat i u embryí kostlína, kde v nejanteriornější části pozorujeme pouze epiteliální endodermální předústní střevo a nad ním ležící ektoderm (**Tab.12D**). Stejnou situaci můžeme pozorovat i u embryí bichira, neboť ani zde není v rané neurulaci žádný volný prostor v nejanteriornější části hlavy, a nachází se tam pouze epitel endodermálního předústního střeva (**Tab.25A a 25F**). Struna hřbetní je také v této fázi vytvořena a zatím se její konec zdá být uzavřený (**Tab.1H a 25G**), i když u kostlína se zdá být už rozvolněnější (**Tab.12G**). Podobnou situaci můžeme pozorovat na datech u embryí

**Obrázek 9:** Vlevo - laterální pohled na anteriorní část hlavy embrya žraloka, hlava doleva. nc - struna hřbetní  
Vpravo - řez nejanteriornější částí hlavy, kde se nachází pouze předústní střevo (pog) a neurální ploténka (np). (převzato od Adachi a kol., 2012)



žraloka (Adachi a kol., 2012), kde je zobrazeno jasné epiteliální předústní střevo, ještě dříve, než populace prechordální destičky (**Obrázek 9**). Autoři však překvapivě předústní střevo do své studie nezahrnují (Adachi a kol., 2012). Z mých dat vyplývá, že prechordální destička nevzniká jako nediferencovaná mezendodermální struktura, ale nejprve můžeme jasně rozlišit endodermální epiteliální a chordomezodermální strukturu a až později vznikající mezenchymální populaci.

### 5.1.2. Střední fáze - vznik prechordální destičky ze struny hřbetní a zároveň z endodermu předústního střeva

U nemodelových obratlovců, kterými jsou např. mihule a žralok je prechordální destička popisována tak, že vzniká z rozvolněné struny hřbetní, jež se rozšiřuje až do nejanteriornější části hlavy (kupř. Kuratani a kol., 1999; Adachi a kol., 2012). Uvolňování buněk ze struny hřbetní jsem pozorovala i u mnou zkoumaných druhů (**Tab.3H, 13H a 26G**). Tento děj byl u kostlína a bichira pozorován i pomocí imunohistochemie (**Tab.15B a 29B**). Ovšem v nejanteriornější oblasti hlavy se u těchto druhů stále vyskytuje pouze endodermální epitel předústního střeva a nad ním ležící ektoderm (**Tab.3G, 13F a 26F**). Rozdílný vývoj prechordální destičky oproti daniu (Kimmel a kol., 1995), myši (Aoto a kol., 2009) nebo žraloku (Adachi a kol., 2012) je popisován u embryí kuřete, kde byla popsána tzv. epitel-mezenchymální tranzice (EMT), a to z buněk endodermálního prvostřeva



**Obrázek 10:** Vývoj prechordální destičky u embryí kuřete na mediálním řezu (hlava doprava). Černé šipky ukazují na populaci buněk v přední části prvostřeva, ze které dochází k epitel-mezenchymální tranzici. (převzato od Seifert a kol., 1993).

(**Obrázek 10**) (Seifert a kol., 1993). EMT znamená proces, při kterém se z epiteliálních buněk, která sedí na bazální lamině, stávají buňky mezenchymální, které jsou měňavkovitého tvaru a vyskytují se ve volném prostoru (kupř. Kalluri a Weinberg, 2009). Tento děj se v jiných člancích neobjevuje, neboť obecně se předpokládá, že z endodermálních buněk při normálním embryonálním vývoji EMT neprobíhá, může pouze vznikat z buněk mezodermálních (kupř. Gilbert a Barresi, 2016) nebo z mezektodermálních buněk neurální lišty (kupř. Le Douarin a Kalchauer, 1999). EMT je s endodermálním epitelem spojováno pouze při nádorových onemocnění, a to při metastázách (kupř. Huber a kol., 2005). EMT z endodermálního epitelu při normálním vývoji pozoruji i já ve své práci u jesetera, kostlína i bichira. U jesetera pozoruji uvolňování buněk (**Tab.2A a 3B**), konkrétně v posteriorní části předústního střeva. V této části je vidět, že předústní střevo není jen čistě epiteliální, ale buňky

jsou více neuspořádané a rozvolněné (**Tab.2F a 3G**). U kostlína je posteriorní část předústního střeva rozvolněná (**Tab.13C**), ovšem u něj pozoruji uvolňování buněk i z části prvostřeva ležícího těsně za předústním střevem v rostrální neurální oblasti (**Tab.19G**). U bichira můžeme také pozorovat uvolňování buněk z předústního střeva (**Tab.30A**), ale k uvolňování buněk dochází i v posteriornější části předústního střeva, tedy už pod neurální trubicí (**Tab.30C**). U embryí jesetera můžeme v této posteriorní oblasti předústního střeva pozorovat i expresi genu *twist1* (**Tab.6E**), která se právě vyskytuje při EMT (kupř. Soo a kol., 2002). Pro populaci prechordální destičky by měl být důležitý gen *gsc*, který by ji měl přímo označovat (kupř. Amaya a kol., 1993; Schulte-Merker a kol., 1994; Wnag a kol., 2019). Ovšem tento gen *gsc* je např. u embryí drápatky označován v prechordálním mezodermu (Amaya a kol., 1993), u embryí dánia zase v mezendodermální populaci prechordální destičky (Schulte-Merker a kol., 1994), a to i konkrétně v posteriorní části prechordální destičky (Wang a kol., 2019). U dánia dokonce prechordální destičku označují genem *pitx2* (Wang a kol., 2019), a to v nejanteriornější části, který by však měl při rané embryogenezi označovat endodermální buňky (Faucourt a kol., 2001). Gen *gsc* byl zkoumán i u embryí myši a tam ho autoři označují přímo v endodermu prvostřeva, přičemž tento endoderm vytváří ohyb směrem k mozku (Belo a kol., 1998). V této práci jsem měla možnost otestovat gen *gsc*, a jeho expresi jsem zaznamenala v posteriorní části předústního střeva u embrya jesetera (**Tab.5B a 5E**). Expresie genu *gsc* je popisována tedy velmi nesourodě, podle mého názoru, ale data v této práci dále podporují vznik anteriorní části populace prechordální destičky z posteriorního konce předústního střeva u jesetera, nebo právě i z tzv. polsteru, který je popisován u dánia (Wang a kol., 2019), než že by polster byl přímo část prechordální destičky.

V další fázi vývoji prechordální destičky se v anteriorní oblasti mezenchymální buňky najednou nevyskytují, což je nejspíše způsobeno růstem předního mozku (**Tab.7F, 20F a 31E**). Tento děj probíhá i u embrya žraloka (Adachi a kol., 2012). Autoři popisují, že populace buněk prechordální destičky z této oblasti najednou vymizí a její osud není dále znám (Adachi a kol., 2012). U dalších obratlovců je tato anteriorní populace např. u dánia označovaná jako "hatching gland", tedy žláza, která pomáhá se embryu vylíhnout (Kimmel a kol., 1995). Z mých dat vyplývá, že anteriorní populace prechordální destička nevymizí, ale je spíše vytlačena do laterální oblasti hlavy. V pozdní fázi se pak v anteriorní části, a to na laterální straně hlavy, nachází mezenchym, který byl nejspíše vytlačen právě z mediální části a přispívá do mezenchymu v této oblasti (**Tab.8D, 23G a 32F**). Ovšem nesmíme zapomenout na mezenchymální buňky neurální lišty, které se v této oblasti také již vyskytují (Štundl, 2019), avšak o vzájemných interakcích těchto mezenchymů v rostrální části hlavy není příliš známo (kupř. Noden a Trainor, 2005).

Před strunou hřbetní se začíná formovat shluk posteriorních buněk prechordální destičky, díky postupnému růstu a ohybu předního mozku. Tato populace je stále propojena se strunou hřbetní (**Tab.7G, 14G a 28F**). Podobný průběh můžeme pozorovat i např. u embrya mihule (Kuratani a kol., 1999) a žraloka (Adachi a kol., 2012).

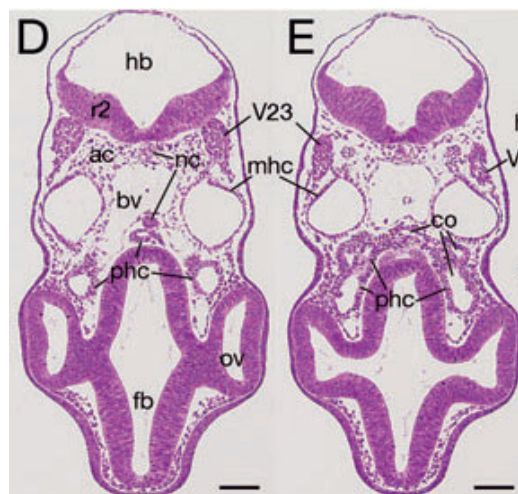


### 5.1.3. Pozdní fáze - buňky prechordální destičky přispívají do hlavového mezenchymu a hlavových kavit

Na začátku pozdní fáze se stále před strunou hřbetní nachází populace buněk prechordální destičky, ovšem od struny hřbetní je už zcela oddělená (**Tab.8C, 20G a 31G**). Stejně je tomu i u embrya mihule (Kuratani a kol., 1999) i žraloka (Adachi a kol., 2012), přičemž je v této fázi nazývána jako premandibulární mezoderm a u kuřete zase jako prechordální mezoderm (Seifert a kol., 1992, Seifert a kol., 1993). V této fázi můžeme porovnávat i vývoj prechordální destičky s dalšími embryi, jako je hybrid jesetera a vyzy (Kuratani a kol., 2000) nebo krokodýl (Kundrát a kol., 2009). Buňky prechordální destičky se začínají rozšiřovat do laterální části hlavy a stávají se součástí mezenchymu (**Tab.9C, 22C a 32C**). V mediální části stále zůstává populace buněk prechordální destičky, nemizí stejně, jak

tomu bylo u anteriorní populace. Dokonce se v této pozdní fázi začíná zase objevovat populace mezenchymálních buněk i v anteriorně-mediální části hlavy, ale odkud pochází, to určit nedokážeme (**Tab.10B, 23E a 32G**). I u embrya hybrida jesetera a vyzy (Kuratani a kol., 2000), mihule (Kuratani a kol., 1999) i žraloka (Adachi a kol., 2012) můžeme vidět rozšiřování populace buněk prechordální destičky z mediální do laterální části hlavy. U embrya krokodýla (Kundrát a kol., 2009) to není na přiložených histologických řezech tak dobře vidět, ale k rozšiřování této populace podle autorů také probíhá. Je možné, že autoři (Kundrát a kol., 2009) už jsou v pozdější fázi vývoje embrya, kde už nedochází k takovému rozšiřování těchto buněk z mediální části hlavy.

V laterální části hlavy se nachází v této pozdní fázi velké množství hlavového mezenchymu (**Tab.9E, 23G a 32F**). Stejně tomu tak je i u dalších embryí jako je žralok (Adachi a kol., 2012) nebo hybrid jesetera a vyzy (Kuratani a kol., 2012). V rostrální oblasti před strunou hřbetní by se měl v této laterální části nacházet mezenchym z prechordální destičky (kupř. Adachi a kol., 2012) a více posteriorně se už nachází paraxiální hlavový mezenchym (kupř. Noden, 1992) rozdělovaný na mandibulární a hyoidní (kupř. Kuratani a kol., 1999). Zaměříme se tedy na mezenchym, který se nachází v okolí výskytu optického vaku. U jesetera se v tomto hlavovém mezenchymu začíná objevovat několik malých dutin (**Tab.8G a 9F**), jež byly u hybrida jesetera a vyzy (Kuratani a kol., 2000) a žraloka popsány jako hlavové cysty (**Obrázek 11**) (Adachi a kol., 2012). Avšak u toho hybrida se už objevuje jedna velká hlavová kavita a vedle ní je znázorněna jedna malá cysta. U žraloka (Adachi a kol., 2012) to vypadá více podobně jako u zkoumaného jesetera v této práci. U kostlína jsme mohli



**Obrázek 11:** Frontální řez hlavy v oblasti optického vaku. Můžeme zde vidět malé cysty (co), které se spojují do premandibulární kavit (phc). (převzato od Adachi a kol., 2012)

také pozorovat několik těchto cyst v oblasti optického váčku (**Tab.23A**). Tyto malé cysty se nejspíše vyskytují i u embrya krokodýla, ale autory jsou popisovány jako satelitní mezodermální kavity a extrapremandibulární kavity (Kundrát a kol., 2009). U bichira se žádné hlavové cysty v mezenchymu v oblasti optického váčku neobjevují (**Tab.32F**).

V pozdějším vývoji se tyto cysty u jesetera spojují dohromady a vytváří větší hlavové kavity (**Tab.11B**). Tyto kavity jsou dvě a jsou spolu vzájemně propojené (**Tab.11J**). Stejně to Kuratani (Kuratani a kol., 2000) ukazují i na svém hybridu jesetera a vyzy, tedy tyto dva páry hlavových kavit jsou spolu částečně propojené (Kuratani a kol., 2000). Dva páry hlavových kavit, premandibulární a mandibulární, jsou popisovány i u plazů (Reptilia), ale u nich jsou na rozdíl od chrupavčitých od sebe zcela oddělené (Wedin, 1949; Kundrát a kol., 2009). U jiných obratlovců tento počet hlavových kavit už objeven nebyl. Tři páry hlavových kavit, tedy největší jejich počet, je popisován u třídy paryb (Chondrichthyes), a to u různých druhů (kupř. Balfour, 1878; van Wijhe, 1882; Adachi a kol., 2012). U kostlína se vytváří pouze jedna hlavová kavita (**Tab.24H**), což by bylo stejně jak je tomu u embrya kuřete, kde se tato hlavová premandibulární kavita popisuje jako derivát prechordální destičky (Adelmann, 1926). Díky pozici, tedy v těsné blízkosti u optického váčku, bude u kostlína hlavová kavita také nejspíše vznikat z populace buněk prechordální destičky a mohly bychom jí nazvat premandibulární (**Tab.24E**). U bichira se hlavové kavity nenachází, ale v oblasti okolo optického váčku je velmi nahuštěná populace buněk mezenchymu (**Tab.34E**). Proč zrovna u bichira nevznikají hlavové kavity, by mohlo být zapříčiněno například tím, že embryo bichira ve stejné fázi vývoje je podstatně menší oproti jeseterovi a kostlínovi. Tím tedy má i méně volného prostoru v rostrální oblasti hlavy. Největší část v této oblasti zabírá hlavně přední mozek, cementové orgány a vnější žábry (**Tab.34E**). Například i u mihule se nevytváří hlavové kavity (Kuratani a kol., 1999), ale v souvislosti s přispíváním do okohybných svalů oka, by u bichira hlavové kavity hráli důležitější roli, a to hlavně v jeho adultní formě života. Bichir je přece jen aktivnější predátor než některé druhy mihulí, což naznačuje, že zrak pro něj bude jedním z důležitých smyslů.

## 6. Závěr

V diplomové práci jsem studovala vznik a vývoj prechordální destičky u třech druhů tzv. bazálních paprskoploutvých ryb - jeseterovi (*Acipenser ruthenus*), kostlínovi (*Atractosteus tropicus*) a bichirovi (*Polypterus senegalus*). U všech druhů jsem detailně analyzovala vývojový vztah prechordální destičky s endodermálním předústním střevem a strunou hřbetní. Tyto náležitosti byly zkoumány pomocí histologické analýzy, imunohistochemie a *in situ* hybridizace.

Z mých dat vyplývá následující. Dříve, než se v rané embryogenezi objeví prechordální destička, se v rostrální oblasti vznikající hlavy již nachází jasně definovatelné epiteliální endodermální předústní střevo, a více posteriorně v mediální části těla chordomezodermální struna hřbetní. V pozdějším vývoji se z posteriorní (neurální) části předústního střeva uvolňují buňky, které dávají vznik anteriorní populaci prechordální destičky, podobně jako je to popisováno u embryí kuřete (Seifert a kol., 1993). Zároveň se z anteriorní struny hřbetní uvolňují buňky, z kterých vzniká posteriorní část prechordální destičky. Anteriorní prechordální destička později díky růstu předního mozku z mediální oblasti mizí, přičemž je nejspíše vytlačovaná do laterální oblasti hlavy. Naproti tomu díky růstu předního mozku se před strunou hřbetní tvoří prostor, v kterém zůstává posteriorní populace prechordální destičky, která je popisovaná i u embryí mihule (Kuratani a kol., 1999), hybrida jesetera a vyzy (Kuratani a kol., 1999), žraloka (Adachi a kol., 2012), krokodýla (Kundrát a kol., 2009) nebo kuřete (Seifert a kol., 1993), přičemž je tato populace nazývaná jako prechordální či premandibulární mezoderm. Z této populace se postupně do laterální oblasti hlavy rozšiřují buňky, a to do okolí optického váčku. Zde se tvoří mezenchym, v kterém se u jesetera a kostlína vytvářejí hlavové cysty, a podobně je tomu i u žraloka (Adachi a kol., 2012) nebo hybrida jesetera a vyzy (Kuratani a kol., 2000). U jesetera se z těchto cyst tvoří dva páry hlavových kavit, které jsou spolu propojené, podobně jako u hybrida jesetera a vyzy (Kuratani a kol., 2000). U kostlína se tvoří jeden pár hlavových kavit, který se vyskytuje i u kuřete (Adelmann, 1926). U bichira jsem hlavové kavity neobjevila, ale v této optické oblasti se u něj nachází velmi nahuštěný mezenchym.

Vývoj prechordální destičky u bazálních paprskoploutvých ryb přinesl mnoho nových informací, pomohl ujasnit původ prechordální destičky, která tedy není nerozlišeného mezendodermálního původu, ale má duální charakter a vzniká z jasných epiteliálních struktur. Ukázalo se, že i hlavové kavity nejsou homologické, i když to jsou všechno "bazální" obratlovci. A v neposlední řadě se podařilo objevit i unikátní populaci hlavového mezenchymu, vznikající epitel-mezenchymální tranzicí přímo z endodermu.



## 7. Citace

- Adachi, N., & Kuratani, S.** (2012). Development of head and trunk mesoderm in the dogfish, *Scyliorhinus torazame*: I. Embryology and morphology of the head cavities and related structures. *Evolution & development*, 14(3), 234-256.
- Adelmann, H.B.,** (1922). The significance of the prechordal plate: an interpretative study. *Am. J. Anat.* 31, 55-101.
- Adelmann, H. B.** (1926). The development of the premandibular head cavities and the relations of the anterior end of the notochord in the chick and robin. *Journal of Morphology*, 42(2), 371-439.
- Allis, E.P.** (1931). Concerning the development of the prechordal portion of the vertebrate head. *J. Anat.* 72, 584-607.
- Allis Jr, E. P.** (1938). Concerning the development of the prechordal portion of the vertebrate head. *Journal of anatomy*, 72(Pt 4), 584.
- Amaya, E., Stein, P. A., Musci, T. J., & Kirschner, M. W.** (1993). FGF signalling in the early specification of mesoderm in *Xenopus*. *Development*, 118(2), 477-487.
- Aoto, K., Shikata, Y., Imai, H., Matsumaru, D., Tokunaga, T., Shioda, S., ... & Motoyama, J.** (2009). Mouse Shh is required for prechordal plate maintenance during brain and craniofacial morphogenesis. *Developmental biology*, 327(1), 106-120.
- \*Balfour, F. M.** (1878). The development of the elasmobranchial fishes. *J. Anat. Physiol.*, 11, 405-706.
- Belo, J. A., Leyns, L., Yamada, G., & De Robertis, E. M.** (1998). The prechordal midline of the chondrocranium is defective in Goosecoid-1 mouse mutants. *Mechanisms of development*, 72(1), 15-25.
- Colas, J F, Schoenwolf, G C.** (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics* 221 (2): 117-45.
- Couly, G.F., Coltey, P. M., & Le Douarin, N. M.** (1992). The developmental fate of the cephalic mesoderm in quail-chick chimeras. *Development*, 114(1), 1-15.
- Dettlaff, T A, Ginsburg, A S, Schmalhausen, O I.** (1993). *Sturgeon Fishes, Developmental Biology and Aquaculture*. Berlin: Springer-Verlag.
- Diedhiou, S, Bartsch, P.** (2009). Staging of the early development of Polypterus (Cladistia: Actinopterygii). In *Development of Non-Teleost Fishes*. Edited by Kunz, Y W, Luer, C A, and Kapoor, B G. New Hampshire: Science Publishers.
- Faucourt M, Houliston E, Besnardeau L, Kimelman D, Lepage T.** (2001). The Pitx2 homeobox protein is required early for endoderm formation and nodal signaling. *Dev Biol.*; 229:287-306.
- Gans, C., Northcutt, R. G.** (1983): Neural crest and the origin of vertebrates: a new head. *Science* 220: 268-273.
- Gans, C., Northcutt, R.G.** (1985). The brain and sense organs of the earliest vertebrates: reconstruction of a morphotype. *Evolutionary Biology of Primitive Fishes* 103, 81 - 112.
- Gaisler, J., & Zima, J.** (2018). *Zoologie obratlovců*. 3. přepracované vydání. Praha: Academia.

- Gilbert, S. F. and Barresi M. J. F.** (2016). *Developmental biology*. Eleventh edition. Sunderland: Sinauer Associates, Oxford University Press
- Hall, B.K.** (2009). The neural crest and neural crest cells in vertebrate development and evolution. *Springer*
- Hamilton, L.** (1969). The formation of somites in *Xenopus*. *J. Embryol. exp. Morph.* 22, 253-264.
- Huber, M. A., Kraut, N., & Beug, H.** (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology*, 17(5), 548-558.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A.** (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.
- Kardong, K.V.** (2014): *Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution*. McGraw-Hill.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.
- Kundrát, M., Janáček, J., & Martin, S.** (2009). Development of transient head cavities during early organogenesis of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Journal of morphology*, 270(9), 1069-1083.
- Kuratani, S.** (2005). Cephalic neural crest cells and the evolution of craniofacial structures in vertebrates: morphological and embryological significance of the premandibular-mandibular boundary. *Zoology*, 108(1), 13-25.
- Kuratani, S., Horigome, N., & Hirano, S.** (1999). Developmental morphology of the head mesoderm and reevaluation of segmental theories of the vertebrate head: evidence from embryos of an agnathan vertebrate, *Lampetra japonica*. *Developmental biology*, 210(2), 381-400.
- Kuratani, S., Nobusada, Y., Saito, H., & Shigetani, Y.** (2000). Morphological characteristics of the developing cranial nerves and mesodermal head cavities in sturgeon embryos from early pharyngula to late larval stages. *Zoological Science*, 17(7), 911-933.
- Kuratani, S., & Adachi, N.** (2016). What are Head Cavities?—A History of Studies on Vertebrate Head Segmentation. *Zoological science*, 33(3), 213-228.
- Le Douarin, N., & Kalcheim, C.** (1999). *The neural crest* (No. 36). Cambridge University Press.
- Long, W L, Ballard, W W.** (2001). Normal embryonic stages of the longnose gar, *lepisosteus osseus*. *BMC Developmental Biology* 1: 6.
- Lipton, B. H. & Jacobson, A. G.** (1974a). Analysis of normal somite development. *Devi Biol.* 38, 73-90.
- Meier, S.** (1981). Development of the chick embryo mesoblast: morphogenesis of the prechordal plate and cranial segments. *Developmental biology*, 83(1), 49-61.
- Minarik, M., Stundl, J., Fabian, P., Jandzik, D., Metscher, B. D., Psenicka, M., Gela, D., Osorio-Pérez, A., Arias-Rodriguez, L., Horáček, I., et al.** (2017). Pre-oral gut contributes to facial structures in non-Teleost fishes. *Nature* 547, 209–212.

- Minařík M.** (2017). Vývoj, evoluce a homologie přichytných žláz a orgánů nižších obratlovců, Přf Univerzity Karlovy, Praha
- Montero, J. A., Carvalho, L., Wilsch-Bräuninger, M., Kilian, B., Mustafa, C., & Heisenberg, C. P.** (2005). Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation. *Development*, 132(6), 1187-1198.
- Noden, D. M.** (1992). Morphogenetic movements of avian prechordal mesoderm. *Anat Rec*, 232, 65A.
- Noden, D. M., Marcucio, R., Borycki, A. G., & Emerson, C. P.** (1999). Differentiation of avian craniofacial muscles: I. Patterns of early regulatory gene expression and myosin heavy chain synthesis. *Developmental Dynamics*, 216(2), 96-112.
- Noden, D. M., & Trainor, P. A.** (2005). Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *Journal of anatomy*, 207(5), 575-601.
- Northcutt, R. G., Gans, C.** (1983): The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins. *Q. Rev. Biol.* 58, 1–28.
- Oisi, Y., Ota, K. G., Kuraku, S., Fujimoto, S., & Kuratani, S.** (2013). Craniofacial development of hagfishes and the evolution of vertebrates. *Nature*, 493(7431), 175-180.
- Onai, T., Irie, N., & Kuratani, S.** (2014). The evolutionary origin of the vertebrate body plan: the problem of head segmentation. *Annual review of genomics and human genetics*, 15, 443-459.
- \*Oppel, A.** (1890). U ber Vorderkopf-Somite und die Kopfhöhle bei Anguilla fragilis. *Arch. Mik. Anat.* 36, 603–627.
- Psychoyos, D., & Stern, C. D.** (1996). Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development*, 122(5), 1523-1534.
- Robb, L., & Tam, P. P.** (2004). Gastrula organiser and embryonic patterning in the mouse. *In Seminars in cell & developmental biology*, 15(5), 543-554.
- Sambasivan, R., Kuratani, S., & Tajbakhs, hS.** (2011). An eye on the head: the development and evolution of craniofacial muscles. *Development*, 138(12), 2401-2415.
- Satoh, N.** (2016). Chordate Origins and Evolution: The Molecular Evolutionary Road to Vertebrates. Academic Press.
- Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Helde, K. A., Talbot, W. S., & Driever, W.** (1997). The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. *Development*, 124(2), 327-342.
- Schlosser G** (2005). Evolutionary origins of vertebrate placodes: insights from developmental studies and from comparisons with other deuterostomes. *J Exp Zool Mol Dev Evol* 304B, 347– 399.
- Schoenwolf, G. C., Garcia-Martinez, V., & Dias, M. S.** (1992). Mesoderm movement and fate during avian gastrulation and neurulation. *Developmental dynamics*, 193(3), 235-248.
- Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M., Beuchle, D., Cho, K. W., De Robertis, E. M., & Nusslein-Volhard, C.** (1994). Expression of zebrafish goosecoid and no tail gene products in wild-type and mutant no tail embryos. *Development*, 120(4), 843-852.



- Seifert, R., Jacob, H. J., & Jacob, M.** (1992). Differentiation capabilities of the avian prechordal head mesoderm. *Formation and Differentiation of Early Embryonic Mesoderm* (pp. 63-76). Springer US.
- Seifert, R., Jacob, M., & Jacob, H. J.** (1993). The avian prechordal head region: a morphological study. *Journal of anatomy*, 183(Pt 1), 75-89.
- Soo, K., O'Rourke, M. P., Khoo, P. L., Steiner, K. A., Wong, N., Behringer, R. R., & Tam, P. P.** (2002). Twist function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo. *Developmental biology*, 247(2), 251-270.
- Sugahara, F., Pascual-Anaya, J., Oisi, Y., Kuraku, S., Aota, S. I., Adachi, N., ... & Kuratani, S.** (2016). Evidence from cyclostomes for complex regionalization of the ancestral vertebrate brain. *Nature*.
- Suzuki, D. G., Fukumoto, Y., Yoshimura, M., Yamazaki, Y., Kosaka, J., Kuratani, S., & Wada, H.** (2016). Comparative morphology and development of extra-ocular muscles in the lamprey and gnathostomes reveal the ancestral state and developmental patterns of the vertebrate head. *Zoological letters*, 2(1), 10.
- Štundl, J.** (2013). Srovnání migrace a morfogeneze neurální lišty u evolučně důležitých zástupců paprskoploutvých ryb s cílem charakterizovat vývojové zdroje kraniofaciální diverzity, Přf Univerzity Karlovy, Praha
- Štundl, J.** (2019). Analýza buněk neurální lišty a raného kraniofaciálního vývoje u vybraných zástupců paprskoploutvých ryb, Přf Univerzity Karlovy, Praha
- \*van Wijhe JW** (1882) Über die Mesodermsegmente und die Entwicklung der Nerven des Selachierkopfes. Ver. Akad. Wiss. Amsterdam, Groningen pp 1-50
- Wachtler, F., Jacob, H. J., Jacob, M., & Christ, B.** (1984). The extrinsic ocular muscles in birds are derived from the prechordal plate. *Naturwissenschaften*, 71(7), 379-380.
- Wang, H., Holland, P. W., & Takahashi, T.** (2019). Gene profiling of head mesoderm in early zebrafish development: insights into the evolution of cranial mesoderm. *EvoDevo*, 10(1), 14.
- Wedin, B.** (1949). The development of the head cavities in Alligator mississippiensis Daud. *Lunds Univ. Arsskr. NF avs. 2*, 45, 1-32.
- Winklbauer, R., & Schurfeld, M.** (1999). Vegetal rotation, a new gastrulation movement involved in the internalization of the mesoderm and endoderm in Xenopus. *Development*, 126(16), 3703-3713.
- Winklbauer, R., & Damm, E. W.** (2012). Internalizing the vegetal cell mass before and during amphibian gastrulation: vegetal rotation and related movements. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(2), 301-306.

\* sekundární citace